

Identification d'une nouvelle molécule d'intérêt chez le cheval atteint d'obstruction récurrente des voies respiratoires: La Pentraxine 3

**Identification of a new molecule of interest in the recurrent airway
obstruction-affected horse: The Pentraxin 3**



Eve RAMERY

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES
ANNEE ACADEMIQUE 2009-2010**

« La vie est un rêve, fais en une réalité.
La vie est un défi, fais lui face.
La vie est mystère, perce-le. »

Extrait de l'*Hymne à la vie*, **Mère Teresa** (1910-1997)

Résumé

L'ORVR ou obstruction récurrente des voies respiratoires (ORVR) est la cause la plus fréquente de maladie pulmonaire chronique chez le cheval adulte. La maladie se caractérise par une hyperréactivité bronchique, une production excessive de mucus et une inflammation neutrophilique pulmonaire qui ont pour effet de réduire la compliance dynamique du poumon et d'augmenter la résistance des voies respiratoires au débit aérien. Alors que la maladie est une entité documentée dans la littérature depuis plus de 200 ans, les mécanismes moléculaires qui la sous-tendent restent incomplètement élucidés à ce jour. De précédentes études ont montré l'implication de variations d'expression génique, pour la plupart grâce à l'utilisation combinée de la transcription inverse et de la réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR). Cette technique bien connue ne permet l'étude que d'un nombre limité de gènes en simultané. Les microdamiers apparaissent comme la technique de choix pour l'étude de l'expression génique à large échelle. A l'heure où cette étude a débuté, il n'existait pas de microdamier d'expression spécifiquement dédié au cheval sur le marché. Un microdamier hétérologue humain (Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip, Affymetrix®) a donc été utilisé pour tenter d'identifier de nouveaux gènes d'intérêt pour comprendre la pathogénie de l'ORVR chez le cheval.

L'utilisation du microdamier a permis de détecter 46 gènes dont l'expression variait d'un facteur supérieur à 4 entre chevaux sains et atteints. Parmi les gènes mis en avant par le microdamier, trois gènes (*CYBB*, *MARCKS* et *PTX3*) présentaient un intérêt particulier au regard de la littérature et leur variation d'expression a été confirmée par RT-PCR quantitative (RT-qPCR). La pentraxine 3 (PTX3) notamment appartient à la composante humorale de la réponse immune innée. Elle agit comme un ancêtre fonctionnel des anticorps. En effet, elle reconnaît les microbes, active le complément et facilite la reconnaissance de certains pathogènes spécifiques,

dont *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), par les phagocytes. La suite du travail s'est donc focalisée sur PTX3.

L'ADN complémentaire (ADNc) codant pour *PTX3* et l'ADN codant pour le second exon de *PTX3* ont été clonés et séquencés. L'ADN codant pour le second exon de *PTX3* équivalait présentait une délétion de 120 paires de bases par rapport à la séquence humaine. Par ailleurs, un épissage alternatif du second exon de *PTX3* a été mis en évidence, résultant en deux formes de la protéine, "épissée" (32 kilodaltons) et "complète" (42 kilodaltons).

Afin d'étudier les effets de l'exposition à des poussières de foin sur l'expression de PTX3 dans les voies respiratoires, six chevaux sains et six chevaux atteints d'ORVR ont été soumis pendant dix jours à un challenge environnemental aux poussières de foin. Les chevaux ont été étudiés via des tests cliniques, fonctionnels et biochimiques. Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été récoltés lors de l'initiation du protocole et après les dix jours d'exposition aux poussières de foin. Par ailleurs, des sections bronchiques ont été réalisées chez deux chevaux atteints d'ORVR en crise et euthanasiés pour raisons éthiques et deux chevaux indemnes d'affections respiratoires provenant de l'abattoir. PTX3 était détectée dans les macrophages du LBA après exposition aux poussières de foin et dans les cellules épithéliales bronchiques. PTX3 était surexprimée dans les macrophages du LBA chez tous les chevaux après dix jours d'exposition aux poussières de foin. Cependant, le niveau de PTX3 était plus élevé dans le surnageant des cellules provenant des chevaux atteints d'ORVR que dans celui provenant des cellules des chevaux sains. Par ailleurs, il semble que PTX3 soit surexprimée dans les cellules épithéliales bronchiques chez le cheval atteint d'ORVR. Cette piste est intéressante sur le plan thérapeutique puisque l'activation de l'expression de PTX3 dans les cellules épithéliales bronchiques est sous le contrôle du facteur c-Jun N-terminal kinase (JNK), un facteur différent

de celui qui contrôle l'expression de PTX3 dans les leucocytes, à savoir le facteur nucléaire kappa B (NF-κB).

L'effet de différents stimuli sur la production et l'excrétion de PTX3 par les cellules du LBA a été étudié *ex-vivo* après mise en culture et stimulation à la poussière de foin, au lipopolysaccharide (LPS), à *A. fumigatus* et avec une solution saline tamponnée pour le phosphate (PBS), utilisée comme contrôle. La présence de PTX3 a été mesurée par Western Blot six heures et vingt-quatre heures après les différentes stimulations dans les cellules et dans les surnageants respectivement. PTX3 était détectée dans les cellules et dans les surnageants mais aucune différence significative d'expression n'a pu être mise en évidence que ce soit entre les différents stimuli, entre les différents temps ou avec le contrôle. Ces résultats suggèrent que la poussière de foin est un inducteur indirect de PTX3.

Summary

Recurrent airway obstruction (RAO) is the first respiratory disease in adult horses. Environmental causes of RAO are well described, but the molecular mechanisms of the disease remain unclear. Previous studies have highlighted the implications of variations in gene expression in the disease, most using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). This well-known technique limits the number of genes that can be studied in a single assay. The microarray appears to be the platform of choice for massively parallel gene expression profiling and provides a good tool for exploratory research. However, at the time of the experiment, there was no equine-specific microarray available on the market. Because they are commercially available, highly specific and well annotated, human and mouse large-scale microarrays are an exploratory alternative to equine-specific microarrays.

The first part of the present study was performed to highlight new targets not previously related to the disease and able to improve our understanding of the molecular mechanisms of the disease. A human microarray (Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip, Affymetrix[®]) was used to study gene expression in nucleated cells originating from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in RAO-affected horses. A total of 46 candidates were identified with differentially regulated genes between RAO-affected horses and controls. Based on their documented function, five of these genes were selected for the real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR) validation procedure: *CYBB*, *MARCKS* and *PTX3*. The RT-qPCR results confirmed those obtained with the microarray, pointing out these genes as new directions for future experiments. In particular, the long pentraxin 3 (PTX3) plays an important role in the host defence and over-expression of PTX3 may contribute to airways injury. Therefore, it was hypothesised that PTX3 may have relevance in the understanding of the pathogenesis of RAO.

In the second part of the study, PTX3 and its implication in RAO in horses were characterized in more details. Six healthy horses and six RAO-affected horses were submitted to a dusty environment challenge. *PTX3* DNA and cDNA were cloned and sequenced. A 120bp deletion was found in the DNA of the second exon of equine *PTX3* in comparison to human *PTX3*. In addition, an alternative splicing of the second exon of *PTX3* occurred, resulting in two forms of the protein: "spliced" (32 kilodaltons) and "full length" (42 kilodaltons). The pentraxin domain was very well conserved in the two forms with 94% of amino-acids conserved between equines and humans.

The effects of dust exposure and subsequent RAO crisis on PTX3 expression in the BALF and the bronchial epithelial cells were studied. Dust exposure induced PTX3 *in vivo* in BALF macrophages both in healthy horses and in RAO-affected horses. However, PTX3 was over-expressed in the BALF supernatant and, interestingly, in the bronchial epithelial cells from RAO-affected horses in crisis. Considering epithelial cells as one of the major cell types in the airways, PTX3 produced at this level may play an important role in the disease process.

The effects of different components (*ie* lipopolysaccharide and *A. fumigatus*) and different concentrations of hay dust suspension upon PTX3 expression and excretion in BALF cells have been tested *ex-vivo* and compared to control (*ie*. Phosphate-Buffered Saline). PTX3 was detected in cells and cell culture supernatant under all conditions but there was no difference between conditions including the control. These results suggest that dust is an indirect inducer of PTX3.

Remerciements

Ce travail de doctorat n'aurait pas été possible sans la contribution non seulement scientifique mais aussi affective de nombreux intervenants.

Je voudrais tout d'abord adresser un grand merci à la famille élargie de la physio. Ces quatre années passées en son sein ont été quatre années de bonheur.

En particulier, je voudrais remercier le Professeur Pierre Lekeux qui est parvenu à vaincre mon appréhension vis-à-vis de la recherche et à me faire découvrir tout ce qu'elle a de passionnant. Je le remercie non seulement d'avoir mis à ma disposition les moyens et le temps nécessaires à la réalisation de ce projet, mais aussi de m'avoir laissé la possibilité de me tromper et d'apprendre de mes erreurs en me laissant une grande liberté de travail.

Le Professeur Fabrice Bureau m'a guidée sur le plan scientifique et méthodologique dans la réalisation de mes expériences tout au long de ce travail. Je le remercie pour ses conseils éclairés et finalement pour m'avoir accordé sa confiance.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers le Professeur Tatiana Art, présente à toutes les étapes de ce travail. Pas un manuscrit, rapport, poster, proceeding qu'elle n'ait patiemment relu et corrigé. Pas un protocole où elle n'ait apporté son aide, son sens de l'organisation, son esprit critique. Pas une présentation à laquelle elle n'ait contribué. Quand personne n'avait le temps, elle le trouvait.

J'adresse un merci tout particulier au Docteur Audrey Fraipont avec qui j'ai partagé bien plus que mon bureau. C'est main dans la main que nous avons traversé ces années aussi bien dans la réalisation de nos protocoles que dans la vie. Sa présence, son écoute, sa patience m'ont permis de surmonter les moments de découragements et je lui dois bien plus encore. Elle saura lire entre les lignes.

Je remercie le Docteur Emmanuelle Van Erck pour m'avoir transmis ses connaissances en médecine sportive, pour son amitié et sa générosité, les moments intenses partagés au cours de l'aventure "MSHN".

Je remercie également mes autres "sœurs" de physio les Docteurs Emanuelle Salinas, Marie Toussaint, Marie-Christine Wagemans, Valérie Simon et Dorine Olejnik pour leur aide dans les protocoles, leur camaraderie et leur esprit d'émulation; sans oublier le docteur Marie-Capucine avec qui les conversations toujours animées ont souvent été génératrices de bonnes idées.

Merci à toute l'équipe des "biomols" pour leur accueil au GIGA et leur contribution à la réalisation de ce travail. En particulier, je tiens à remercier Monsieur Rodrigue Closset qui, de son vivant, a largement contribué aux manipulations moléculaires et en particulier à la caractérisation du gène *PTX3* dans l'espèce équine, le Docteur Laurence Fievez pour son aide appréciable dans l'apprentissage des techniques de laboratoire, le Professeur Michel Georges et les Docteurs Benoît Hennuy, Christophe Desmet et Dimitri Pirottin pour leurs conseils avisés concernant l'utilisation des outils de biologie moléculaire.

Je remercie Monsieur Jean-Clément Bustin pour son aide dans la réalisation des protocoles, pour m'avoir vaillamment accompagnée dans les abattoirs et pour la gestion quotidienne des chevaux. Ce qui m'amène à remercier les chevaux de la physio sans lesquels il n'y aurait pas eu de thèse possible, avec une pensée particulière pour "Vaqui".

Merci à Madame Ilham Sbaï pour sa disponibilité et son efficacité sans faille mais aussi sa chaleur, sa joie de vivre, son positivisme communicatif. Je remercie également Madame Raja Fares et Madame Martine Leblond pour leurs relectures attentives du manuscrit et le travail de bibliographie.

Pour leur support financier, je tiens à remercier chaleureusement le Fonds pour la Recherche à l'Industrie et à l'Agriculture (FRIA), le Fonds National pour la Recherche Scientifique (FNRS), la fondation Equine Research Fund et les Haras Nationaux (France).

Je remercie le Docteur Olivier Jacqmot pour son aide précieuse et éclairée dans la dissection des chevaux au cours des études post-mortem.

Je remercie le Docteur Dominique Cassart qui a accepté de se pencher avec moi sur les coupes de poumons de chevaux sains et atteints d'ORVR.

Je remercie le Docteur Frédéric Farnir pour son aide lors de l'interprétation statistique de certains résultats.

Je remercie le Docteur Bernard Mignon qui a aimablement accepté de me procurer la souche d'*Aspergillus fumigatus* utilisée pour les manipulations *ex-vivo* de ce travail et le Professeur Jacques Mainil qui m'a permis d'utiliser son laboratoire pour les manipulations associées.

Je remercie le Professeur Nadine Antoine, Madame Joëlle Piret et Madame Monique Henket grâce à qui j'ai acquis les compétences nécessaires à la réalisation et à l'interprétation des colorations immuno-histochimiques liées à ma thèse.

Je remercie Madame Sylvie Henrard pour son aide dans la constitution du dossier de thèse et la traduction des documents nécessaires à "l'épopée irlandaise".

Merci également à l'équipe de la bovine et en particulier aux Docteurs Vincent Frisée et Guillaume Lamain et à Madame Nathalie Chometton pour leur soutien logistique.

Je remercie mes parents d'avoir cru en moi et de m'avoir donné les moyens de poursuivre les études vétérinaires dont je rêvais. Ils m'ont aussi inculqué la volonté et la persévérance, qualités sans lesquelles je ne serais jamais parvenue au terme de ce doctorat.

Je remercie Madame Anne-Marie Guyot pour avoir accepté de relire attentivement ce manuscrit de thèse afin de minimiser le nombre de fautes d'orthographe et de grammaire.

Surtout, surtout, *Last but not least*, je remercie mon amour, le Docteur Hugues Guyot pour son aide précieuse dans l'achèvement de cette thèse, son soutien inconditionnel et indéfectible. Ses encouragements et sa patience m'ont offert les meilleures conditions possibles pour terminer cette thèse.

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléotidique

ADNc: ADN complémentaire

A. fumigatus: *Aspergillus fumigatus*

AP1: Activator protein 1

ARN: Acide ribonucléotidique

ARNm: ARN messenger

C1q: Premier composant de la voie classique d'activation du complément

CD: Cellule dendritique

CDp: CD plasmacytoïde

CD Mo: CD dérivée de monocyte

CD My: CD myéloïde

COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

CRP: C-reactive protein,

CYBB: Cytochrome b(-245), beta subunit

EST: Expressed sequence tag

FGF2: Fibroblast growth factor 2

GC: Glucocorticoïde

IAD: Inflammatory airway disease

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

IOS: Système d'oscillométrie par impulsions

JNK: c-Jun N-terminal kinase

kDa: Kilodaltons

KO: Knock-out

LBA: Lavage broncho-alvéolaire

LPS: Lipopolysaccharide

MARCKS: Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate

MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1

NET: Neutrophil extracellular traps

NF- κ B: Nuclear factor kappa B

NK: Natural killer

NO: Oxyde nitrique

Omp-A: Outer membrane protein A

ORVR: Obstruction récurrente des voies respiratoires

PAMP: Pathogen-associated molecular pattern

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PGN: Peptidoglycan

PMN: Polymorphonucléaire neutrophile

Poly I:C: Acide polyonisable polycytidylique

PRR: Pattern recognition receptor

PTX3: Pentraxine 3

RT-PCR: Reverse transcription by polymerase chain reaction

RT-qPCR: Real time quantitative reverse transcription by polymerase chain reaction

SAP: Serum amyloid P component, Composant amyloïde P sérique

SP-1: Secretory protein 1

TH: T helper

TLR: Toll-like receptor

TNF: Tumor necrosis factor

TSG-6: TNF- α -induced protein 6

Table des matières

Résumé	3
Summary	6
Remerciements	8
Liste des abréviations	12
Table des matières	14
1. Introduction	17
1.1. L'obstruction récurrente des voies respiratoires	18
1.1.1. Etymologie	18
1.1.2. Manifestations cliniques	21
1.1.3. Etiologie	22
1.1.4. Lésions caractéristiques	24
1.1.5. Hypersensibilité	24
1.1.6. Héritéité	25
1.1.7. Mécanismes inflammatoires	26
1.1.8. NF- κ B	27
1.2. Les microdamiers d'expression	30
1.2.1. Expression génique	30
1.2.2. Défi technique lié à la mise à disposition des génomes	32
1.2.3. Présentation des microdamiers	33
1.2.4. Utilisation des microdamiers	35
1.2.5. Exploitation des résultats	35

1.2.6. Limites des investigations transcriptomiques	37
1.3. La Pentraxine 3: PTX3	38
1.3.1. La superfamille des pentraxines	38
1.3.2. Structure de PTX3	39
1.3.3. Sources cellulaires et inducteurs	41
1.3.4. Régulation	44
1.3.5. Ligands de PTX3	45
1.3.6. Rôle de PTX3 dans l'inflammation	47
1.3.7. PTX3: Le cas particulier d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	49
1.3.8. Autres rôles de PTX3 (fertilité et activité anti-angiogénique)	49
1.3.7. Conclusions	50
2. Objectifs du travail	53
3. Présentation synoptique des résultats	54
3.1. Etude 1: Utilisation d'un microdamier humain associé à la RT-qPCR pour identifier de nouveaux gènes d'intérêt chez les chevaux atteints d'ORVR	54
3.1.1. Partie1: Mesure de l'expression génique par microdamier	55
3.1.2. Partie 2: Mesure de l'expression génique par RT-qPCR	56
3.1.3. Conclusion de la première étude	57
3.2. Etude 2: Caractérisation de la Pentraxine 3 et de son expression dans les voies respiratoires chez le cheval	58
3.2.1. Partie 1: Caractérisation de PTX3	59
3.2.2. Partie 2: Expression de PTX3 en réponse à des poussières de foin <i>in-vivo</i>	61
3.2.3. Partie 3: Expression de PTX3 en réponse à différents constituants des poussières de foin <i>ex-vivo</i>	63
3.2.4. Conclusions de la 2 ^{ème} étude	64

4. Discussion générale	65
5. Conclusions et perspectives	71
5.1. Conclusions	71
5.2. Perspectives	72
5.2.1. Perspectives des moyens d'investigation	72
5.2.2. Perspectives fondamentales	72
5.2.3. Perspectives thérapeutiques	73
5.2.4. Perspectives diagnostiques	74
6. Bibliographie	76

1. Introduction

Les muqueuses respiratoires, en particulier dans les voies respiratoires supérieures, sont exposées de manière continue à une myriade d'antigènes environnementaux. La plupart de ces antigènes, notamment d'origine végétale et animale, sont non pathogènes mais hautement immunogènes confrontant sans cesse le système immunitaire à ses limites. L'équilibre du système immunitaire respiratoire repose donc sur la capacité du système à discriminer ce bruit de fond antigénique des antigènes pathogènes (Figure 1). Lorsque l'équilibre est rompu, une inflammation chronique des voies respiratoires se développe.

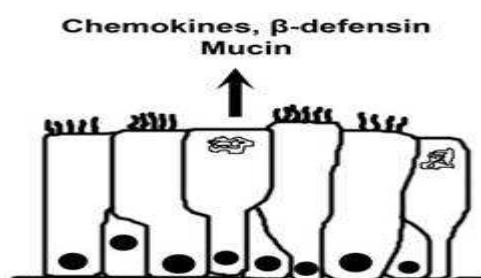


Figure 1: Cellules épithéliales ciliées et cellules à gobelet (contenant du mucus) recouvrant les voies respiratoires profondes, première ligne de défense contre les particules inhalées. Les cellules épithéliales éliminent ces particules en augmentant le mouvement ciliaire, en piégeant les particules dans du mucus et en intervenant sur la réponse immune.

L'obstruction récurrente des voies respiratoires (ORVR) est la cause la plus fréquente de maladie pulmonaire chronique chez le cheval adulte (Bowles *et al.*, 2002). La maladie se caractérise par une hyperréactivité bronchique, une production excessive de mucus et une inflammation neutrophilique pulmonaire qui ont pour effet de réduire la compliance dynamique du poumon et d'augmenter la résistance des voies respiratoires au débit aérien (Ainsworth *et al.*, 2003). Elle survient en réponse à l'inhalation de poussières organiques incluant les spores d'actinomycètes (eg. *Aspergillus fumigatus*) et les endotoxines présentes dans le fourrage et la litière. Une rémission est obtenue lorsque les animaux sont tenus éloignés des agents causatifs

(Robinson, 2001). Cette maladie présente des similitudes avec l'asthme humain et la broncho-pneumopathie chronique obstructive sur le plan symptomatologique (bronchospasme) et avec la maladie du poumon du fermier (*lung's farmer disease*) sur le plan physiopathologique (neutrophilie pulmonaire). Les manifestations cliniques de la maladie chez le cheval vont d'une intolérance à l'effort avec toux chez les sujets modérément atteints à une détresse respiratoire sévère chez les sujets gravement atteints.

Alors que des avancées considérables dans la connaissance des composants organiques qui induisent la maladie ont été réalisées ces dernières années, la pathophysiologie de l'inflammation pulmonaire manifestée lors d'ORVR est toujours mal comprise.

1.1. L'obstruction récurrente des voies respiratoires

1.1.1. Etymologie

Chez le cheval, la maladie est une entité documentée dans la littérature depuis plus de 200 ans (Clarke, 1728). Elle doit son surnom de pousse, *heaves* en anglais, à la dyspnée expiratoire qui la caractérise. Avec l'arrivée des moyens d'évaluation de la fonction pulmonaire moderne, les cliniciens ont réalisé que la pousse n'était que la partie émergée de l'iceberg. Beaucoup de chevaux présentent de l'inflammation des voies respiratoires sans que celle-ci soit associée à des signes cliniques manifestes au repos. Ces observations ont eu lieu comme les médecins humains tentaient de différencier l'asthme et la maladie pulmonaire obstructive chronique plus connue sous son appellation anglophone *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD).

Chez l'homme, l'asthme et la COPD sont toutes deux des maladies qui impliquent une obstruction des voies respiratoires. Dans les deux maladies une inflammation chronique du tractus respiratoire se développe suite à une expression accrue de multiples protéines de

l'inflammation, incluant cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, enzymes et récepteurs pro-inflammatoires (Kraft, 2006). Dans les deux maladies des épisodes aigus ou crises se manifestent quand l'intensité de l'inflammation augmente. La plupart des cytokines et des chimiokines qui sont secrétées aussi bien lors d'asthme que de COPD sont régulées par un facteur de transcription, le facteur nucléaire κ B (NF- κ B). Ce dernier est activé dans les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages des deux maladies et pourrait avoir un rôle important dans l'amplification de l'inflammation des voies respiratoires (Hart *et al.*, 1998; Caramori *et al.*, 2003).

Mais en dépit de ces similarités, il existe d'importantes différences entre les deux maladies (Barnes, 2000). L'obstruction qui se développe dans l'asthme est variable et réversible tandis qu'elle est progressive et en grande partie irréversible dans la COPD. L'inflammation associée à l'asthme implique principalement les grandes voies respiratoires et n'implique pas le parenchyme pulmonaire. Au contraire, la COPD affecte principalement les petites voies respiratoires et le parenchyme pulmonaire (Jeffery, 2000). L'inflammation qui se développe lors d'asthme est souvent décrite comme éosinophilique tandis que la COPD est décrite comme neutrophilique. Ces différences sont dues à la sécrétion de facteurs chimiotactiques différents. En effet, dans l'asthme les facteurs chimiotactiques et les chimiokines libérées par les cellules épithéliales des voies respiratoires sont principalement attractives pour les éosinophiles (*eg.* eotaxine 1) tandis que dans la COPD ils sont principalement attractifs pour les neutrophiles (*eg.* IL-8). Enfin, chez les patients asthmatiques le mécanisme immunitaire qui prédomine est une réponse lymphocytaire de type TH2 tandis que chez les patients atteints de COPD c'est une réponse de type TH1 (Barnes, 2008).

Chez le cheval, l'appellation COPD a dans un premier temps été adoptée pour la pousse en raison du caractère neutrophilique de l'inflammation associée à la maladie. Cette appellation a

été étendue à tout cheval qui présentait des signes d'atteinte des voies respiratoires profondes en l'absence de contamination bactérienne. Ce n'est qu'en 2000 qu'un groupe international d'experts a cherché à clairement définir les phénotypes associés à la COPD (Anon, 2001). Des différences manifestes sont alors apparues entre la COPD humaine et la COPD équine. Notamment, la pousse se rapproche plus de l'asthme de par l'implication des larges voies respiratoires et non du parenchyme pulmonaire et de par son caractère réversible lorsque l'agent causatif (poussière de foin) est évité. Le terme COPD a alors été abandonné au profit du terme RAO pour *recurrent airway obstruction* soit obstruction récurrente des voies respiratoires (ORVR) en français.

L'ORVR est définie comme une obstruction des voies respiratoires mesurable, induite par l'exposition à des poussières organiques, qui survient chez les chevaux adultes, réversible par changement d'environnement et qui répond favorablement au traitement par broncho-dilatateur (Robinson, 2006). Les formes moins sévères d'inflammation chronique des voies respiratoires ont été regroupées sous le terme de maladie inflammatoire des voies respiratoires (IAD). La relation exacte entre IAD et ORVR reste inconnue à ce jour. Tout comme pour l'asthme et la COPD chez l'homme, il semblerait qu'en réalité une pléiade de mécanismes sous-tende ces maladies dont les manifestations se chevauchent (Barnes, 2008). C'est ce qui expliquerait d'ailleurs, au moins en partie, l'hétérogénéité des réponses aux traitements.

1.1.2. Manifestations cliniques

Une description détaillée des symptômes de l'ORVR a été réalisée par Robinson (2001) et par Leguillette (2003). Les signes cliniques de l'ORVR sont récurrents mais réversibles. En effet, les symptômes sont exacerbés lorsque les chevaux atteints d'ORVR sont exposés à des débris organiques pendant quelques jours (Couëtil *et al.*, 2001) mais une nette amélioration est visible, dans la plupart des cas, dès que les animaux sont placés dans un environnement contrôlé ou remis au pré. Les animaux les moins sévèrement atteints présentent généralement une intolérance à l'exercice, un délai de récupération après l'effort prolongé et des accès de toux pendant l'exercice, le nettoyage des box ou les repas (Robinson, 2001).

Selon la sévérité de la maladie, d'autres symptômes peuvent être observés tels que du jetage nasal, du tirage nasal et/ou costal, du pompage annal et parfois une fréquence respiratoire augmentée. Dans les cas chroniques, une hypertrophie du muscle oblique externe se développe suite aux efforts abdominaux importants réalisés pendant la phase expiratoire de la respiration (Baily, 2001; Leguillette, 2003). Cette hypertrophie est appelée "ligne de pousse". Chez les animaux les plus sévèrement atteints, on peut observer une dégradation de l'état général et une perte de poids.

Selon le stade de la pathologie des bruits respiratoires anormaux peuvent être entendus. Ainsi des bruits bronchovésiculaires, des sifflements à l'expiration et des crépitements en périphérie du poumon peuvent être audibles à l'auscultation. Dans les rares cas où un emphysème se développe, la percussion du thorax pourra également révéler une résonance exagérée causée par l'accumulation d'air dans les poumons (Robinson, 2001).

L'examen cytologique du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) obtenu sur des chevaux atteints d'ORVR montre une neutrophilie relative et absolue (Figure 2) avec un nombre total de leucocytes normal (Moore *et al.*, 1995).

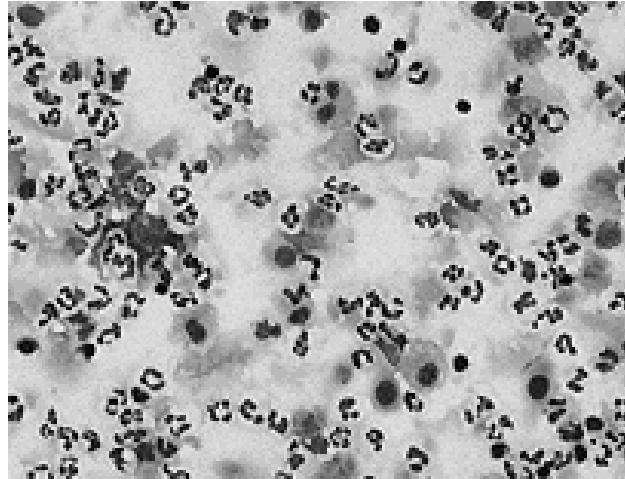


Figure 2: Cytospin du LBA d'un cheval atteint d'ORVR en crise. L'image montre une proportion augmentée de neutrophiles.

Simultanément à l'invasion du poumon par les neutrophiles, une obstruction des voies respiratoires profondes se développe (Robinson, 2001). Celle-ci est le résultat du bronchospasme, de l'accumulation de mucus et des modifications de la paroi des voies respiratoires suite aux mécanismes inflammatoires (Figure 3).

1.1.3. Etiologie

L'ORVR serait initiée par l'inhalation de débris organiques dont les principales sources sont représentées par le foin et les litières apportés aux chevaux qui passent la plupart de leur temps au box. Ces débris contiennent une variété de composants tels que des allergènes des endotoxines, des β -glucanes ou de petites particules susceptibles d'initier l'inflammation pulmonaire (Robinson, 2001).

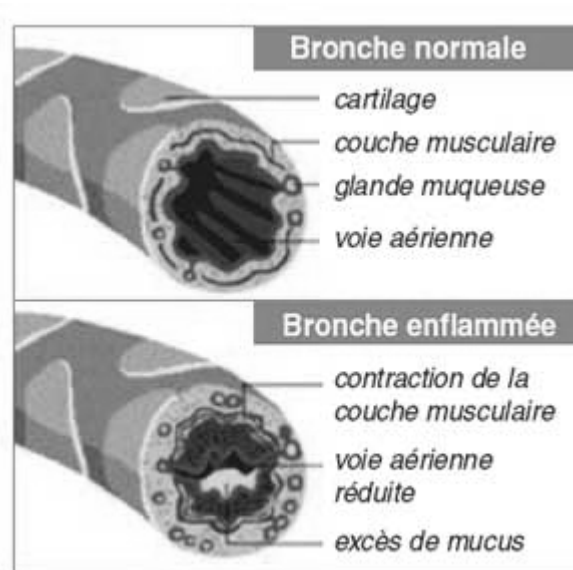


Figure 3: Mécanismes menant à l'obstruction des voies respiratoires chez le cheval atteint d'ORVR en crise.

L'importance relative de chacun de ces agents dans l'étiologie de l'ORVR est inconnue mais il semblerait que la pathogénicité de certains (*eg.* moisissures) soit potentialisée par la présence d'autres agents (*eg.* endotoxines bactériennes). Une combinaison de plusieurs facteurs retrouvés dans l'environnement des chevaux sensibles semble participer à l'étiologie de l'ORVR mais l'étiopathogénie précise reste toujours inconnue (Leguillette, 2003).

Cependant des taux élevés d'immunoglobuline (Ig) E dans le liquide de LBA récolté sur des chevaux atteints d'ORVR soutiennent l'hypothèse que l'ORVR serait une réponse allergique à des moisissures thermophiles ou des actinomycètes, notamment *Faeni rectivirgula*, *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) ou *Thermoactinomyces vulgaris* (Robinson, 2001).

Par ailleurs, la question d'un rôle possible des bactéries dans le développement de l'ORVR se pose, ce qui expliquerait partiellement la bronchiolite à neutrophiles (Dixon *et al.*, 1995).

1.1.4. Lésions caractéristiques

L'ORVR est généralement décrite comme une bronchiolite diffuse avec des bouchons de mucus contenant des neutrophiles dans la lumière des voies respiratoires et une inflammation mononucléaire dans le tissu connectif péribronchiolaire (Breeze, 1979; Thurlbeck et Lowell, 1964). Sont également rapportés une hyperplasie épithéliale, de la métaplasie des cellules à mucus, de la fibrose bronchiolaire, de l'hypertrophie des muscles lisses et un nombre élevé de mastocytes. Cependant aucune de ces études n'inclut un groupe contrôle bien défini. Des études plus récentes (Lugo *et al.*, 2006; Bartner *et al.*, 2006), tendent à montrer qu'il n'existe pas de différences anatomo-pathologiques significatives entre les lésions observées sur des poumons de chevaux atteints d'ORVR et les lésions observées sur des poumons de chevaux contrôles, d'âge comparable, soumis aux mêmes conditions environnementales. En revanche, il existerait une association significative entre le score inflammatoire et le nombre de cellules à mucus dans les petites bronches dans les deux groupes de chevaux.

1.1.5. Hypersensibilité

L'ORVR semble provenir d'une réponse immunitaire spécifique exagérée, donc une hypersensibilité, mais les connaissances actuelles ne permettent pas d'affirmer de quel type.

Le fait que les signes cliniques soient exacerbés par l'inhalation de foin moisi a conduit les chercheurs à croire que l'ORVR serait une réaction allergique à des moisissures ou à des spores d'actinomycètes. Les hauts niveaux d'IgE détectés dans le liquide de LBA de chevaux atteints d'ORVR (Halliwell *et al.*, 1993) supportent l'hypothèse de l'intervention d'une réaction d'hypersensibilité de type I suivie d'une hypersensibilité de type IV comme dans l'asthme chez l'homme. Cependant, l'absence de phase de réaction précoce chez le cheval suggère un rôle

limité des mastocytes sensibilisés aux IgE dans la pathogenèse de l'ORVR (Cordeau *et al.*, 2003).

La théorie qui consiste à considérer l'ORVR comme un modèle animal de l'asthme humain, c'est-à-dire une réaction allergique (hypersensibilité de type IV induite par un allergène), possède ainsi certaines limites. Alors que l'hypersensibilité de type IV induite par un allergène est caractérisée par une éosinophilie marquée, tous les auteurs s'accordent sur le fait que le cheval atteint d'ORVR présente une inflammation neutrophilique. De plus, le temps de réaction dans l'ORVR est plus faible que dans l'hypersensibilité de type IV (respectivement 4 à 6 heures contre 8 à 12 heures). Par ailleurs, l'ORVR semble présenter des similitudes avec la réaction d'hypersensibilité de type III. La présence massive de neutrophiles dans le liquide du LBA des chevaux atteints d'ORVR, la présence d'IgG ainsi que le temps de réaction après stimulation antigénique (4 à 6 heures) coïncideraient avec une hypersensibilité de type III comme dans la maladie du poumon du fermier et du poumon du travailleur de coton. Ces maladies se développent suite à l'exposition à des poussières organiques, de foin moisi et de coton respectivement (Rylander, 1992). Elles présentent de grandes similitudes avec l'ORVR du cheval. Notamment, les signes cliniques, l'aspect récurrent de la maladie ainsi que l'absence de symptômes lorsque l'antigène est évincé sont comparables. Il existe cependant une différence quant à la localisation de la lésion, l'inflammation se situant au niveau des bronches chez le cheval alors qu'elle atteint les alvéoles dans la maladie du poumon du fermier (Warren, 1977).

1.1.6. Hérité

Une prédisposition familiale pour l'ORVR a été identifiée dès 1939 par Schaeper. Des études de génétique des populations impliquant des familles de propres frères et sœurs et des familles

de demi-frères, demi-sœurs ont prouvé une prédisposition génétique (Gerber, 1989, Marti *et al.*, 1991). L'analyse par ségrégation dans deux familles de demi-frères et sœurs a démontré une héritabilité élevée [$h^2=1$], ainsi qu'un mode de transmission complexe de l'ORVR (Gerber *et al.*, 2009; Ramseyer *et al.*, 2007). Une analyse complète du génome de ces chevaux a permis d'identifier deux régions chromosomiques (sur ECA 13 et ECA 15) présentant une association significative avec l'ORVR ($P < 0,05$) et onze régions chromosomiques présentant une association plus modeste (Swinburne *et al.*, 2009). L'utilisation de microsatellites et de marqueurs des facteurs de signalisation épithéliaux a permis d'identifier l'interleukine (IL)-4RA comme gène candidat dans une des familles (Jost *et al.*, 2007).

1.1.7. Mécanismes inflammatoires

Après stimulation antigénique, un grand nombre de neutrophiles s'accumulent dans les poumons des chevaux atteints d'ORVR. L'importance de la composante neutrophilique de l'inflammation dans l'ORVR est en grande partie due au contenu en endotoxines de la poussière inhalée (Pirie *et al.*, 2003), ce qui montre une composante immunitaire innée dans la sévérité de l'inflammation lors d'ORVR.

Des lymphocytes T sont également recrutés au niveau des bronches (Robinson *et al.*, 1996; Leguillette, 2003). Ces cellules ainsi que celles résidant dans le poumon (mastocytes, macrophages, cellules endothéliales et épithéliales) constituent une source potentielle de médiateurs inflammatoires impliqués dans la pathogénèse de l'ORVR. Au cours des dernières années un certain nombre d'études a porté sur la question du rôle des cellules T dans les pathologies équinées. Concernant l'ORVR, il existe à ce jour des études qui rapportent une réponse T helper (TH) prédominante de type 2 (Lavoie *et al.*, 2001, Beadle *et al.*, 2002, Cordeau *et al.*, 2003) avec surexpression des IL-4 et 5 dans les cellules sécrétantes et une augmentation des niveaux d'acide ribonucléotidique messenger (ARNm) des IL-4 et 13 dans les

cellules du LBA des chevaux atteints d'ORVR. D'autres études reportent l'implication d'une réponse de type TH1 (Ainsworth *et al.*, 2003). D'autres encore suggèrent qu'aucune de ces deux réponses ne serait impliquée (Kleiber *et al.*, 2005). Enfin, l'implication d'une réponse de type TH17 a été suggérée (Debrue *et al.*, 2005). Ces résultats contradictoires pourraient être en partie dus au fait que ces études ont été réalisées sur des groupes de chevaux différents et à des moments différents du développement de la pathologie (Marti *et al.*, 2008).

1.1.8. NF- κ B

Un récepteur pour NF- κ B est contenu dans le site d'initiation de la majorité des gènes inflammatoires exagérément exprimés lors d'ORVR. Or, NF- κ B est fortement activé dans les cellules du LBA et dans les cellules récoltées sur l'épithélium bronchique de chevaux atteints d'ORVR en crise comparés avec des chevaux sains (Bureau *et al.*, 2000a). Par ailleurs, les complexes NF- κ B présents dans les cellules bronchiques des chevaux atteints d'ORVR ne sont pas des hétérodimères p65-p50 classiques mais des homodimères p65 (Bureau *et al.*, 2000a). Ces derniers sont des transactivateurs préférentiels d'*ICAM 1*, lequel intervient dans l'inflammation des voies respiratoires. De plus, les homodimères p65 induisent l'expression de l'IL-8, chimioattractrice des neutrophiles (Matsukura *et al.*, 1999). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'ORVR est associée à une inflammation neutrophilique et non éosinophilique. NF- κ B régule également l'expression de gènes codant pour l'IL-1 β et le *tumor necrosis factor* (TNF)- α , cytokines pro-inflammatoires qui, à leur tour, induisent l'activation de NF- κ B. Ces boucles d'auto-activation auraient un rôle primordial dans la persistance de l'activité de NF- κ B dans ces cellules (Bureau *et al.*, 2000b). En effet, dans les cellules bronchiques des chevaux, les boucles d'auto-activation sont normalement interrompues par de puissantes boucles auto-inhibitrices qui sont principalement régulées par I κ B- β . Or, chez les chevaux atteints d'ORVR exposés à d'abondants stimuli inducteurs de l'inflammation, la production basale d'I κ B- β dans

les cellules bronchiques est insuffisante pour inhiber les boucles auto-activatrices de grande amplitude initiées lors de la crise (Bureau *et al.*, 2000a). Il en résulterait une libération accrue de radicaux libres et de protéases engendrant les dysfonctions et lésions pulmonaires. En effet, les crises d'ORVR sont associées à une augmentation significative des marqueurs du stress oxydatif (*eg.* glutathion oxydé et ratio du glutathion réduit et oxydé) dans le liquide bordant l'épithélium pulmonaire. Ces marqueurs sont significativement corrélés avec le nombre de neutrophiles dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (Art *et al.*, 1999).

En résumé, l'action des antigènes au niveau des voies respiratoires profondes stimule la libération de cytokines, engendrant l'activation de facteurs de transcription, lesquels permettent l'expression des gènes inflammatoires (Figure 4). Les inflammations récurrentes des voies respiratoires sont ainsi associées à une expression exagérée des gènes codant pour les protéines inflammatoires intervenant dans les réponses immunes et inflammatoires. Connaître l'expression de ces gènes devrait donc permettre de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'ORVR.

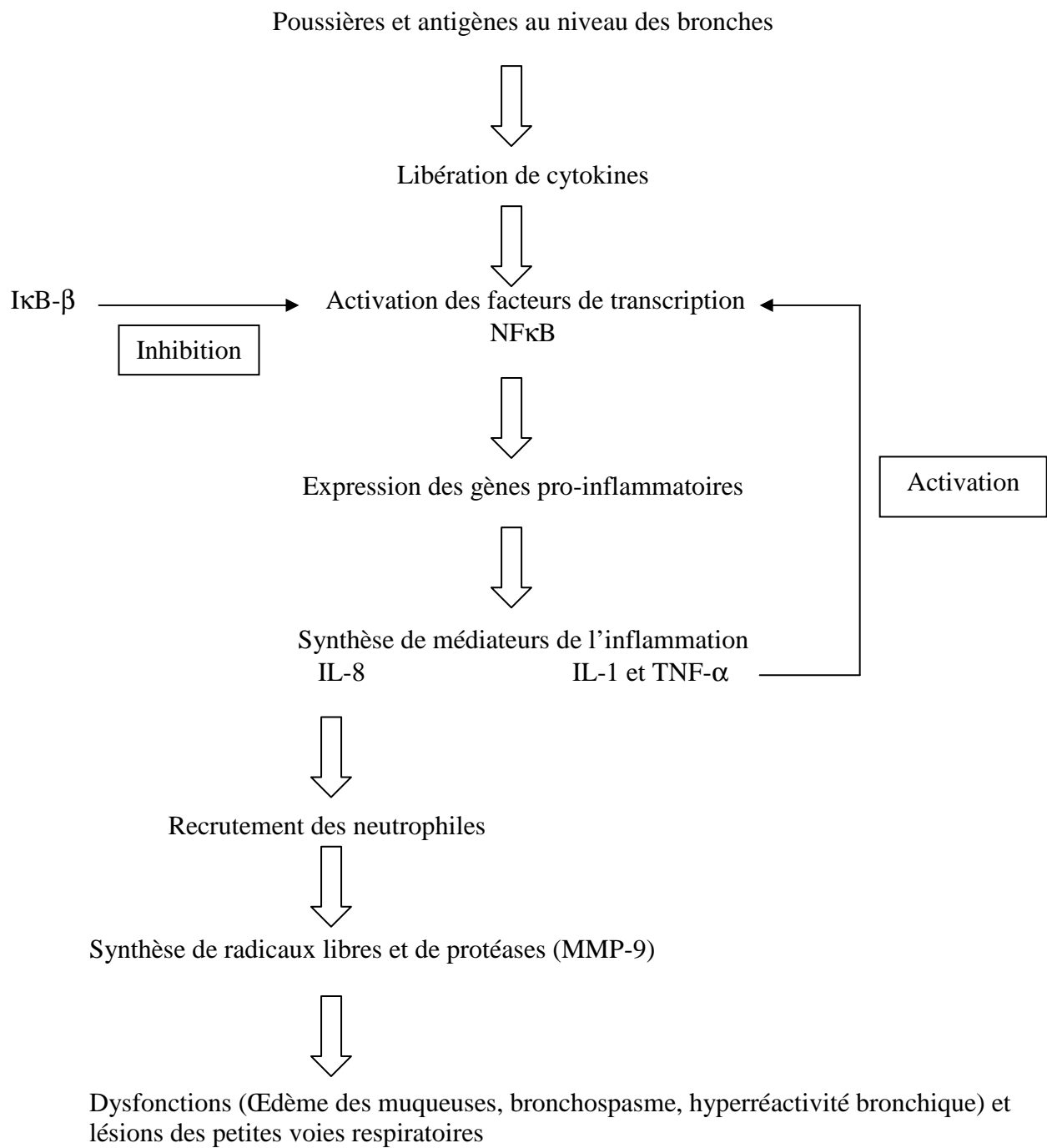


Figure 4: Cascade de l'inflammation probable lors d'obstruction récurrente des voies respiratoires (Mesnil *et al.*, 2006).

1.2. Les microdamiers d'expression

Expression microarrays in equine sciences. Ramery E, Closset R, Art T, Bureau F, Lekeux P. Vet Immunol Immunopathol. 2009, 127, 197-202.

Les microdamiers d'expression sont des outils de screening puissant pour identifier les profils d'expression clés qui sont influencés par l'environnement, la maladie, la nutrition ou tout processus du développement tissulaire. La force de cette technologie provient de sa capacité à mesurer simultanément le niveau d'ARNm de milliers de gènes (Dawson, 2006).

L'analyse du profil d'expression génique grâce à l'utilisation de microdamiers est une orientation nouvelle et prometteuse pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les maladies. Différentes tentatives visant à clarifier la pathogénèse de l'asthme humain ont été réalisées à l'aide de cet outil (Izuhara et Saito, 2006). Ces études ont apporté de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic, des cibles thérapeutiques ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes pathogéniques de l'asthme. Ainsi, en médecine humaine, l'utilisation du microdamier chez l'individu asthmatique a permis de confirmer l'implication de certains gènes tels que NOS2A et GPX3 (Laprise *et al.*, 2004) mais elle a aussi permis de mettre en évidence l'implication de mécanismes jusqu'alors inconnus tels que l'équilibre arginine-arginase (Zimmerman *et al.*, 2003). Par ailleurs, les profils d'expression génomique obtenus grâce à cette technique devraient permettre d'évaluer la sévérité de la maladie (Hansel *et al.*).

1.2.1. Expression génique

La très grande majorité des cellules d'un animal contient un jeu chromosomique complet et des gènes identiques: la totalité de l'information nécessaire pour créer un être vivant complet. Cependant, seule une petite partie de ces gènes est active (on dit qu'ils s'expriment) et c'est ce

sous-ensemble "exprimé" qui confère leurs propriétés uniques à chaque type cellulaire. "L'expression génique" est le terme utilisé pour décrire la transcription de l'information contenue dans l'acide désoxyribonucléique (ADN) en molécules d'ARNm qui sont ensuite traduites en protéines, lesquelles réalisent la plupart des fonctions essentielles des cellules (Figure 5).

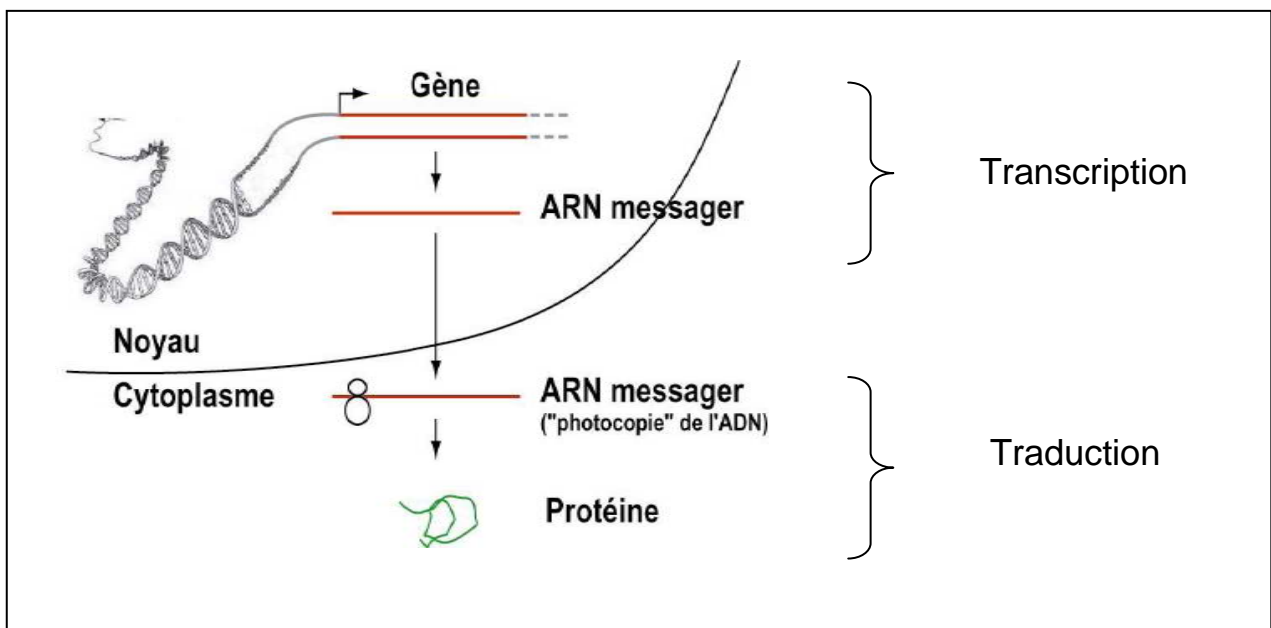


Figure 5: Etapes nécessaires à la synthèse d'une protéine au départ de la séquence génique.

L'expression génique est un processus complexe et finement régulé qui permet à une cellule de répondre dynamiquement à la fois aux stimuli environnementaux et à ses propres besoins changeants. Ce mécanisme agit aussi bien sur un mode "on/off", qui contrôle quels gènes sont exprimés, que sur un mode \pm , qui régule le niveau d'expression précis de chaque gène. La transcription génique n'est qu'une des étapes du processus régulateur qui conduit à la synthèse de protéines fonctionnelles. Par conséquent, il n'est pas toujours possible de corréler les variations d'ARNm avec des changements protéiques ou phénotypiques (Moody, 2001; Müller et Kersten, 2003). Cependant, l'étude des étapes initiales de régulation de l'expression génique permet de mieux comprendre les processus clés de la régulation métabolique.

1.2.2. Défi technique lié à la mise à disposition des génomes

Les techniques de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Southern* et *Nothern Blot* permettent de mesurer la quantité et la qualité spécifique d'un acide nucléique spécifique (Ainsworth *et al.*, 2003; Giguere *et al.*, 2002; Horohov *et al.*, 2005; Rottman *et al.*, 1996). Ces techniques performantes sont cependant limitées par le nombre de gènes qui peuvent être étudiés simultanément.

A partir du moment où le génome humain, suivi par celui d'autres espèces, a été séquencé, le défi a été d'analyser les niveaux d'expression concomitants de milliers de gènes dans de nombreux types cellulaires différents et sous une variété de conditions expérimentales différentes. Concernant le cheval, le premier assemblage de la séquence du génome équin est disponible depuis janvier 2007. En pratique, 85% du génome a été séquencé car certaines parties du génome sont très difficiles à séquencer. Ce niveau de couverture est équivalent à celui obtenu chez la souris, le rat ou le chien et seul celui de l'homme est supérieur (<http://web.vet.cornell.edu/public/Research/zweig/antczak07.htm>). Le challenge à présent est d'annoter cette carte. Cela implique de comprendre la fonction des gènes et leurs interrelations avec les protéines et l'environnement qui conduisent à la création de systèmes vivants dynamiques et complexes. Différentes méthodes ont ainsi vu le jour afin de comprendre les fonctions du génome à large échelle.

1.2.3. Présentation des microdamiers

Les microdamiers permettent d'étudier simultanément un grand nombre de gènes ou de séquences d'acide ribonucléique (ARN). Le principe de cette technologie repose sur l'appariement de l'ARNm ou de sa séquence ADN complémentaire (ADNc), appelée cible, à un fragment d'ADN de séquence complémentaire appelé sonde, fixé sur un support le plus souvent en verre (Figure 6). Selon ce principe l'adénine (A) est complémentaire à la thymine (T) (ou à l'uracile s'il s'agit d'ARN) et la cytosine (C) à la guanine (G). Les bases complémentaires s'apparient tandis que les bases non-complémentaires se repoussent. Chaque jeu de sondes identiques occupe une position bien précise sur le microdamier qui permet d'identifier à quel gène il correspond. Les cibles sont colorées à l'aide d'un marqueur fluorescent et l'intensité de la fluorescence, à une position donnée du microdamier, indique la quantité relative d'ARNm correspondant présente dans l'échantillon (Figure 7).

Jusqu'ici, peu de travaux portant sur des profils d'expression globaux ont été réalisés chez le cheval. Ces rares études sont essentiellement descriptives et ont surtout visé à valider la technique du microdamier chez le cheval. Elles ont néanmoins permis de mettre en lumière la réponse basique de cellules ou de tissus à des maladies, des challenges toxiques ou des infections (Ramery *et al.* 2007; Ren et Prescott, 2004).

Les microdamiers sont des outils qui permettent d'étudier l'expression de milliers de gènes mais ils dépendent du principe d'hybridation par complémentarité des bases, un processus complexe sujet à des variations expérimentales. C'est pourquoi, encore aujourd'hui, la performance des microdamiers se situe plus à un niveau qualitatif que quantitatif et les résultats de microdamiers doivent être confirmés par des techniques de référence telle que la *real time quantitative reverse transcription by polymerase chain reaction* (RT-qPCR).

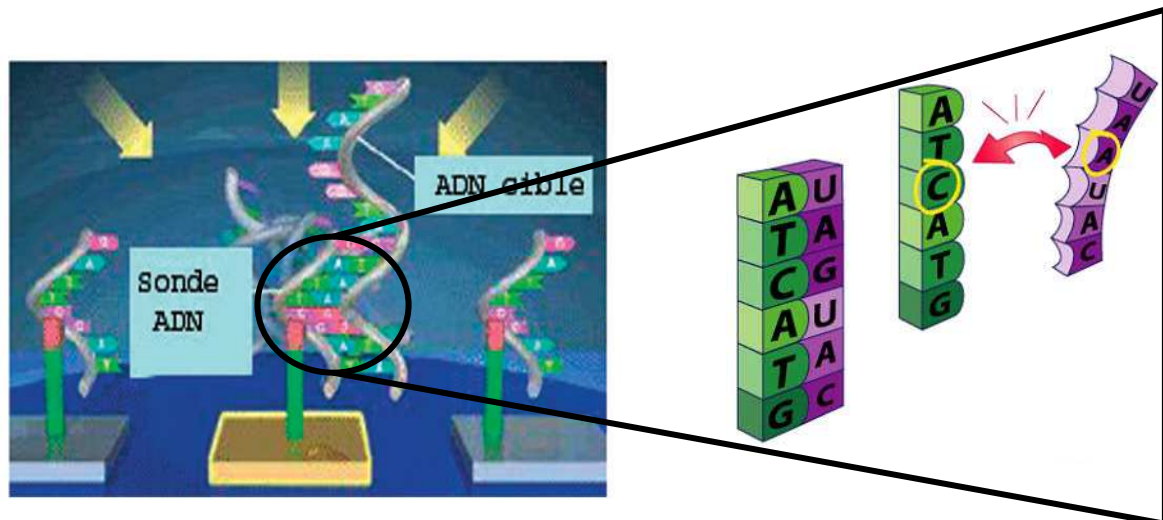
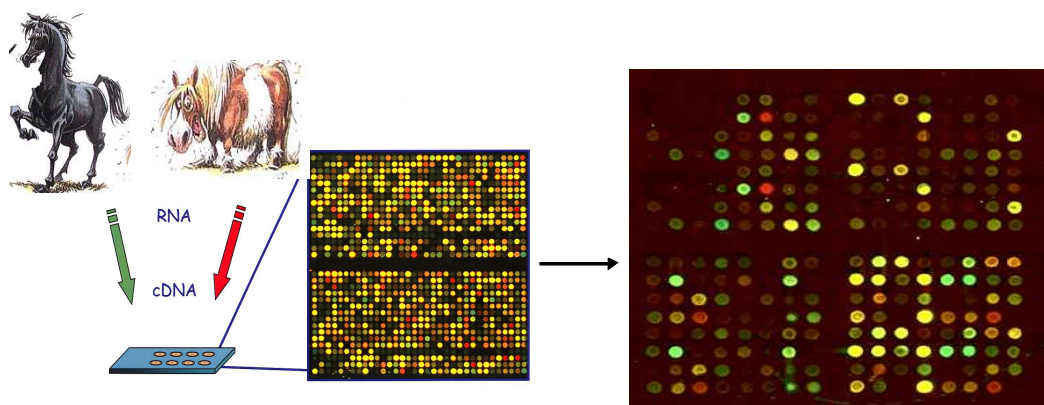


Figure 6: Présentation du principe de complémentarité des bases sur lequel repose l'hybridation des microdamiers: adénine (A) avec thymine (T) et cytosine (C) avec guanine (G).



SPOT ROUGE: le gène est **sur-exprimé** dans les cellules testées.

SPOT VERT: le gène est **sous-exprimé** dans les cellules testées (surexprimé dans les cellules contrôles).

SPOT JAUNE: le gène est **exprimé de manière équivalente** dans les cellules testées et les cellules contrôles.

SPOT NOIR: le gène n'est **pas exprimé** dans les cellules testées ni dans les cellules contrôles.

Figure 7: Lecture et interprétation des microdamiers.

1.2.4. Utilisation des microdamiers

Les séquences nucléotidiques que l'on souhaite étudier sont extraites à partir d'échantillons biologiques (*eg.* cellules du LBA, leucocytes sanguins). Le pool d'ARNm initial est rétro-transcrit en un pool d'ADNc marqué. L'hybridation permet l'appariement spécifique des bases complémentaires de la sonde et de la cible (structure présente dans l'échantillon à tester). Les étapes de lavage permettent d'éliminer les séquences de l'échantillon qui n'ont pas apparié. Le damier est alors scanné et une image informatique est acquise. La position de la sonde complémentaire illuminée sur l'unité d'hybridation permet de déduire l'identité de l'acide nucléique hybridé (Thomas *et al.*, 2005).

Une fois les résultats obtenus, ceux-ci doivent être validés. La validation des résultats se fait en trois phases (Chuaqui *et al.*, 2002):

- contrôle expérimental de la qualité de chaque étape. Celui-ci revient à la firme.
- confirmation indépendante des données. Elle consiste à vérifier les taux d'expression des gènes trouvés dans l'expérience avec des méthodes autres que les microdamiers. La RT-qPCR est la technique de choix à cette fin (Nadon et Shoemaker, 2002).
- assurance de l'universalité des résultats. Elle revient à déterminer si les données obtenues sont des éléments essentiels pour la description de l'état biologique étudié (Figure 8).

1.2.5. Exploitation des résultats

Le profil d'expression est l'étude de la réponse des multiples ARNm (sous forme de concentration résultant de l'expression de leurs gènes correspondants), présents dans un type cellulaire spécifique ou un tissu, à des conditions ou traitements spécifiques. Les éventuelles sur ou sous-expressions géniques peuvent ensuite être mises en relation avec un état

pathologique ou constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Les microdamiers, qui permettent d'étudier simultanément l'expression de milliers de gènes, offrent une vision globale de l'expression des gènes dans une cellule, ce qui est souvent essentiel pour une compréhension globale de sa fonction. Les microdamiers ont ainsi une fonction exploratoire à jouer. Ils permettent en effet d'établir de nouvelles directions pour des recherches futures et peuvent être à l'origine de nouvelles hypothèses de travail.

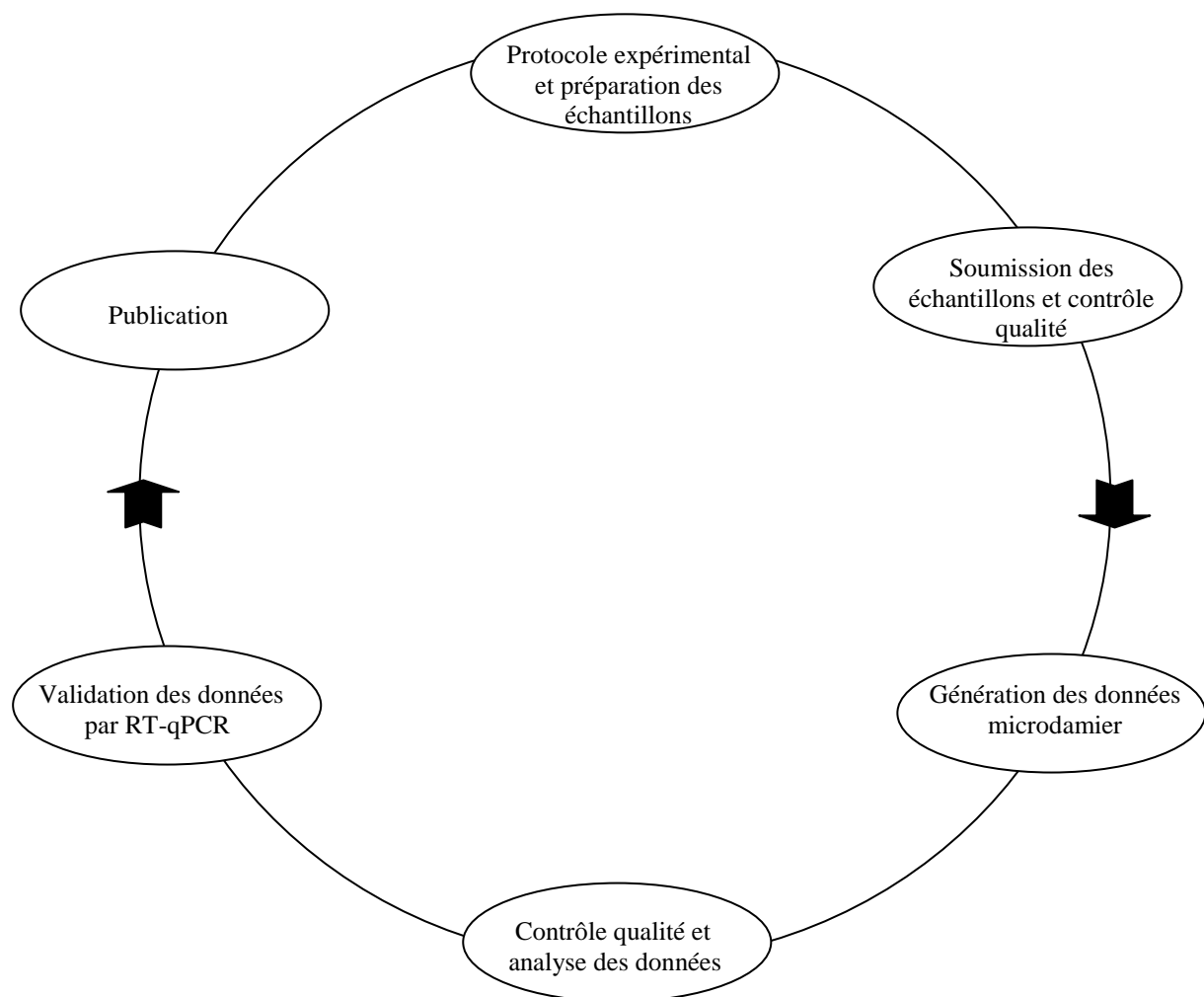


Figure 8: Différentes étapes d'une étude par microdamier.

1.2.6. Limites des investigations transcriptomiques

La transcriptomique est l'étude de l'ensemble des ARNm transcrits à partir d'un génome. Elle vise à déterminer la présence ou l'absence ainsi que la quantité relative d'ARNm codant pour certains gènes dans les cellules et les tissus. Elle permet d'investiguer des mécanismes biologiques complets (Bryant *et al.*, 2004). Cependant, déterminer quels sont les gènes dont la variation d'expression est spécifiquement liée à une maladie représente un challenge. En effet, les variations d'expression au sein d'un organisme permettent à l'organisme de s'adapter à tout moment suivant sa propre biologie (*eg.* rythme nycthémerale, âge, cycle) et en réponse aux multiples variations de l'environnement (*eg.* température, humidité). Les changements d'expression liés à une éventuelle maladie viennent se surimposer à ces variations physiologiques. Par ailleurs, ces variations d'expression peuvent être très rapides et les mesures d'expression n'offrent qu'un instantané du profil d'expression au moment précis du prélèvement. Il peut donc être difficile de déterminer si cet instantané correspond à la phase d'initiation et de développement de la maladie ou déjà à la mise en place des processus de cicatrisation subséquents. Il faut ajouter que l'expression génique n'est qu'une des étapes qui conduisent à la synthèse de protéines fonctionnelles. Suite aux modifications post-transcriptomiques, les variations d'expression génique ne sont pas toujours corrélées à des variations phénotypiques. Enfin, la transcriptomique a pour ambition d'étudier simultanément l'expression de tous les gènes d'une cellule ou d'un tissu. Cette approche génère une quantité considérable de données dont l'analyse requiert des outils statistiques et bioinformatiques spécialisés.

1.3. La Pentraxine 3: PTX3

La Pentraxine 3 (PTX3) appartient à la superfamille des pentraxines, elle-même membre des *pattern recognition receptor* (PRRs). Les PRRs peuvent être exprimés à la surface des cellules ou se retrouver sous forme soluble dans les liquides biologiques. Ils sont capables de reconnaître quelques motifs microbiens déterminés, appelés *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), et activent la composante innée de la réponse immunitaire. Les PRRs de surface incluent les récepteurs endocytiques et les *toll-like receptors* (TLRs). Les composants de l'immunité humorale incluent les membres de la cascade du complément et les PRRs solubles tels que les collectines, les ficolines et les pentraxines (Bottazzi *et al.*, 2006; Garlanda *et al.*, 2005). Les PRRs de la phase fluide forment un groupe hétérogène de familles moléculaires et agissent comme des ancêtres des anticorps. Ils jouent un rôle clé en tant qu'effecteurs et modulateurs de la résistance innée. Les PRRs interagissent avec l'immunité cellulaire innée et PTX3 représente un élément clé de cette interaction.

1.3.1. La superfamille des pentraxines

Les pentraxines constituent une superfamille de médiateurs de la phase aiguë de l'inflammation. Elles se caractérisent par une structure multimérique cyclique et par la présence à leur extrémité carboxy-terminale d'un domaine conservé d'environ 200 paires de bases, nommé le domaine pentraxine (Pepys et Hirschfield, 2003). Les pentraxines sont conservées dans la phylogenèse ce qui pourrait signifier qu'elles confèrent un avantage sélectif.

La protéine réactive C (CRP) qui, avec le composant amyloïde P sérique (SAP), constitue la branche des pentraxines courtes est la première molécule PRR de la phase soluble à avoir été découverte. PTX3, puis les autres pentraxines longues, ont été découvertes plus récemment,

dans les années 1990, comme des gènes inductibles ou des molécules exprimées dans des tissus spécifiques (Brevario et al., 1992). Les pentraxines longues ont un long domaine amino-terminal supplémentaire, couplé au domaine pentraxine carboxy-terminale. Elles diffèrent des pentraxines courtes par leur organisation génique, leur localisation chromosomique, leur source cellulaire et leurs capacités de reconnaissance et d'induction. De récentes études portant sur PTX3 suggèrent l'implication de celle-ci comme composante structurelle de la matrice extracellulaire (Salustri *et al.*, 2004; Scarchilli *et al.*, 2007).

Les pentraxines courtes CRP et SAP sont produites par les hépatocytes en réponse à des médiateurs pro-inflammatoires, notamment l'IL-6 (Figure 9). Dans les tissus périphériques, la pentraxine longue prototypique PTX3 est produite à la fois par les cellules résidentes et par les cellules de l'immunité innée en réponse aux signaux pro-inflammatoires et à l'activation des TLRs. PTX3 se lie et joue un rôle protecteur non redondant vis-à-vis de pathogènes spécifiques comme *A. fumigatus* et les virus influenza (Garlanda *et al.*, 2002; Reading *et al.*, 2008). PTX3 est également impliquée dans des activités sans lien avec des microorganismes telles que la formation du *cumulus oophorus*.

1.3.2. Structure de PTX3

Le gène humain *PTX3* est organisé en trois exons séparés par deux introns. Les deux premiers exons codent respectivement pour le peptide leader et le domaine N-terminal de la protéine tandis que le troisième exon code pour le domaine pentraxine avec une bonne correspondance avec les autres membres de la famille pentraxine.

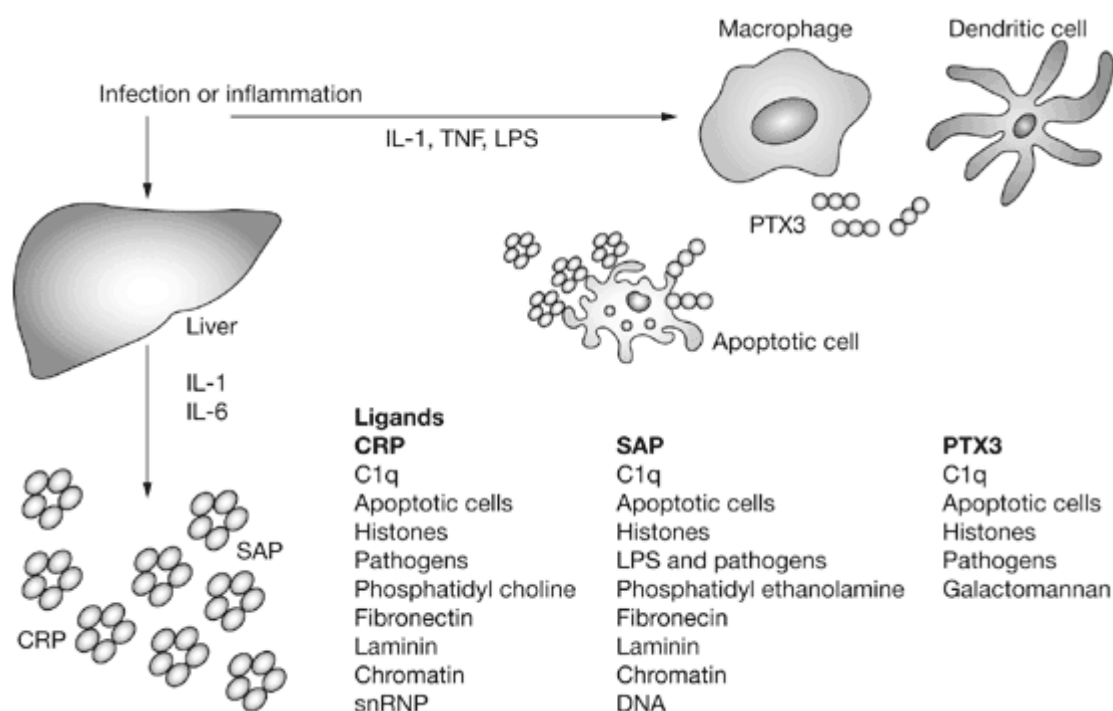


Figure 9: Les pentraxines CRP, SAP et PTX3 (Kravitz et Shoenfeld, 2006).

La protéine humaine PTX3 est longue de 381 acides aminés, incluant le peptide signal de 17 acides aminés. La protéine mature sécrétée a un poids moléculaire prédit de 40 daltons et consiste en un domaine C-terminal "pentraxin-like" de 203 acides aminés couplé à un domaine N-terminal de 178 acides aminés sans lien avec d'autres protéines connues (Figure 10). Un alignement significatif a été observé entre le domaine C-terminal de PTX3 et les courtes pentraxines classiques, avec 57% d'acides aminés conservés et 17% d'acides aminés identiques. L'analyse de la séquence humaine de PTX3 indique la présence d'un site de glycosylation *N-linked* dans le domaine C-terminal sur l'acide aminé Asparagine 220 et ceci explique le poids moléculaire plus élevé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) en conditions réduites (45 kDa au lieu des 40 kDa prédits). Le domaine C-terminal de PTX3 contient la signature canonique pentraxine (HxCxS/TWxS/T), et deux cystéines aux positions 210 et 271, conservées chez tous les membres de la famille pentraxine (Garlanda *et al.*, 2005).

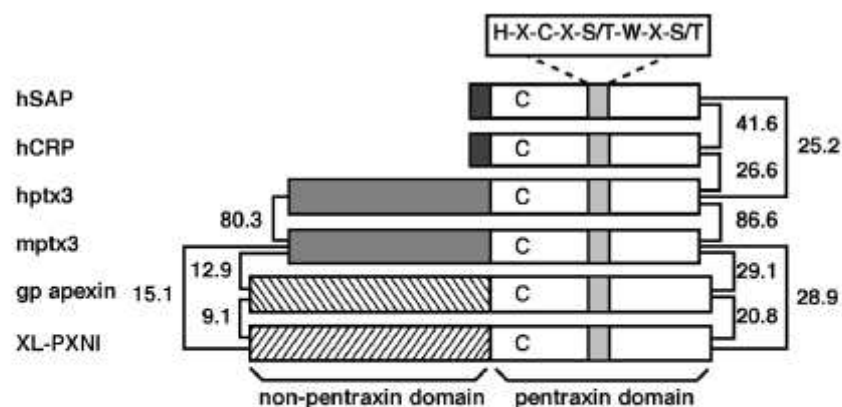


Figure 10: Organisation structurale des pentraxines courtes et longues (Mantovani *et al.*, 2004).

1.3.3. Sources cellulaires et inducteurs

PTX3 a été identifié dans un premier temps comme un gène précocement induit dans les cellules endothéliales vasculaires et les monocytes (Brevario *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993). Les monocytes sanguins périphériques expriment des niveaux significatifs de *PTX3* en réponse aux cytokines pro-inflammatoires $IL-1\beta$ et $TNF-\alpha$ (Tableau 1), suivant un challenge induit par certains composants microbiens (lipopolysaccharide, lipoarabinomannan, *outer membrane proteins*) (Bottazzi *et al.*, 2006; Garlanda *et al.*, 2005; Jeannin *et al.*, 2005). L' $IL-10$ peut également induire *PTX3* et amplifier sa production induite par le lipopolysaccharide (LPS) (Doni *et al.*, 2003). Etant donné le rôle de l' $IL-10$ dans la phase chronique et la résolution de l'inflammation (Moore *et al.*, 2001), l'induction de *PTX3* reflète probablement un rôle dans l'organisation de la déposition de matrice, la réparation tissulaire et le remodelage. L' $IL-6$, principal inducteur de SAP et CRP, de même que les activateurs typiques des monocytes (MCP1 /CCL2, M-CSF, GM-CSF, $INF-\gamma$) sont inactifs (Vidal *et al.*, 1994). D'autres cytokines telles que l' $IL-4$, l' $IL-13$ et l' $INF-\gamma$ inhibent quant à elles la production de *PTX3* induite par le LPS, l' $IL-1\beta$ et le $TNF-\alpha$ (Doni *et al.*, 2006).

Tableau 1: Induction de PTX3 par différentes cytokines dans les cellules humaines.

	TNF- α	IL-1 β	IL-6	INF- γ
Fibroblastes				
Fibroblastes de lignée FS-4	S	S		
Cellules de fibrosarcome, lignée 8387	S	S	No	No
Fibroblastes normaux	S	S	No	No
Cellules endothéliales				
Cellules endothéliales de veine ombilicale	S	S	No	No
Cellules épithéliales				
Cellules épithéliales alvéolaires basales A549	S	S		
Cellules épithéliales primaires de type 2	S	S		
Cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B	S	S		
Cellules épithéliales primaires des petites voies resp.	S	S		
Cellules épithéliales des tubules proximaux du rein	S	S	No	
Cellules hépatiques				
Cellules de carcinome hépatocellulaire Hep3B	S	S	No	No
Leucocytes				
Monocytes	S	S	No	I
Cellules dendritiques myéloïdes		S		

S: Stimulation No: Pas d'effet I: Inhibition

Parmi les leucocytes sanguins périphériques, seuls les monocytes peuvent exprimer l'ARNm codant pour PTX3. Les lymphocytes B et T, les cellules *natural killer* (NK) et les neutrophiles n'expriment pas l'ARNm codant pour PTX3 dans les conditions normales ni après une stimulation appropriée (Vidal *et al.*, 1994). PTX3 peut aussi être induite dans les macrophages dérivés de monocytes *in-vitro*, dans les macrophages péritonéaux murins, et dans les macrophages tumoraux ainsi que dans toute une série de lignées cellulaires myélomonocytiques murines et humaines. Récemment, la présence de PTX3 a été identifiée dans les granules spécifiques lactoferrine-positives de neutrophiles humains (Jaillon *et al.*, 2007). Les éosinophiles et les basophiles ne contiennent pas la protéine. Des études réalisées sur la moelle osseuse de PTX3 montrent que l'ARNm de PTX3 est exprimé dans les précurseurs promyélocytiques et myélocytiques des neutrophiles mais pas dans les neutrophiles segmentés (Jaillon *et al.*, 2007). PTX3 est donc stockée sous une forme "prête à l'emploi" dans les granules des neutrophiles et est rapidement libérée en cas de reconnaissance microbienne. Par

ailleurs, l'analyse des images obtenues par microscopie confocale de neutrophiles activés révèle que PTX3 se localise dans les *neutrophil extracellular traps* (NETs). Les NETs sont des projections de chromatine associées à des protéines nucléaires qui forment une sorte de filet à l'extérieur du neutrophile. Ce filet favorise la capture d'antigènes microbiens (Brinkmann *et al.*, 2004). L'association des NETs et de PTX3 constituerait ainsi un microenvironnement essentiel pour piéger et tuer les microbes (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007) et notamment les conidies d'*A. fumigatus* (Figure 11).

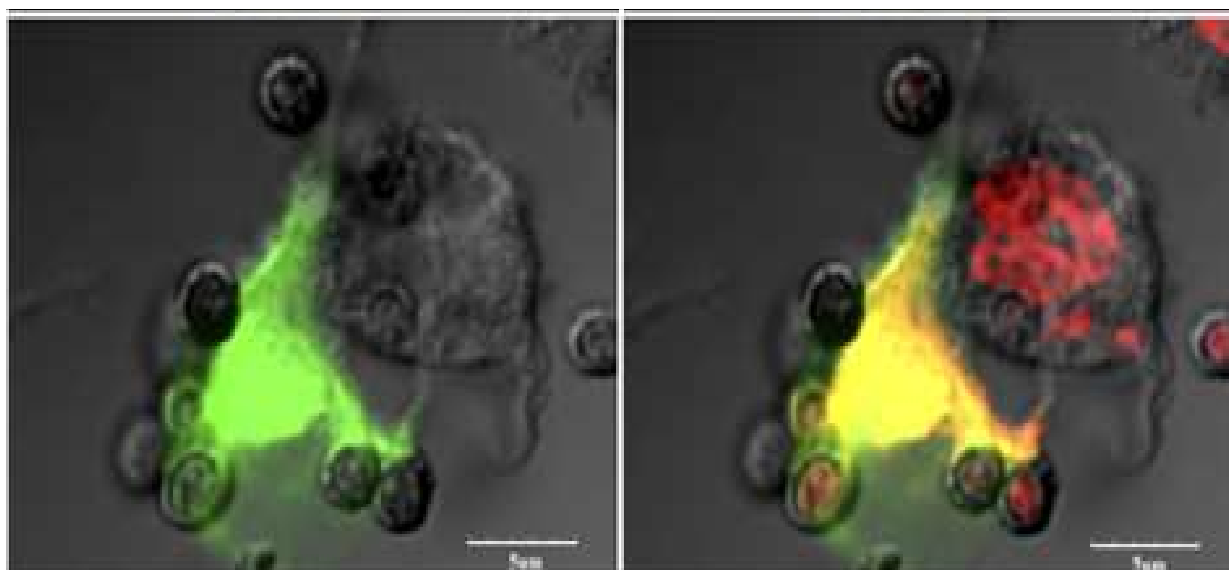


Figure 11: Localisation de PTX3 dans les NETs. Neutrophiles exposés à des conidies d'*A. fumigatus*. Les neutrophiles ne sont pas perméabilisés. L'ADN apparaît en rouge et PTX3 en vert (Contraste d'interférence différentielle, technique Normarski). Barre= 5µm (Jaillon *et al.*, 2007).

Les cellules dendritiques dérivées des monocytes sont quant à elles les meilleures productrices de PTX3 (Tableau 2) en réponse au LPS et aux TLRs tels que *outer membrane protein* (OMP)-A ou peptidoglycan (TLR-2), DNA double brin (TLR-3), *Candida* (TLR-4) et flagelline (TLR-5) (Doni *et al.*, 2003). La production de PTX3 par les cellules dendritiques (CDs) se limite cependant aux CDs myéloïdes tandis que les CDs plasmacytoïdes sont incapables de produire la protéine quel que soit le stimulus impliqué (Doni *et al.*, 2003). D'autres cellules encore que

les cellules endothéliales et celles de la lignée myéloïde sont capables de produire PTX3, notamment les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les adipocytes, les cellules épithéliales pulmonaires et les cellules de la granulosa.

Tableau 2: Rôle des TLRs et des sous-unités microbiennes sur l'expression de PTX3 dans les monocytes, macrophages et cellules dendritiques humaines.

Récepteur	Ligand	Monocytes	Macrophages	CD Mo	CD My	CDp
TLR2	Omp-A			S		
	PGN			S	S	No
TLR3	Poly I:C			S	S	No
TLR4	LPS	S	S	S	S	No
	Conidies	S		S	S	No
TLR5	Flagelline			S		
TLR9	CpG ODN			No		No
Autres micro-organismes						
	<i>Mycobacterium bovis</i>	S				
	<i>P.aeruginosa</i>			S	S	No
	Virus Influenza					No

S: Stimulation

No: Pas d'effet

CD Mo: CD dérivées de monocytes, CD My: CD myéloïdes, CDp: CD plasmacytoïdes

Omp-A: *Outer membrane protein A*, PGN: Peptidoglycan,

Poly I:C: Acide polyonisé polycytidylique

1.3.4. Régulation

Afin de comprendre la régulation de la protéine, le promoteur proximal du gène *PTX3* chez l'homme et chez la souris a été séquencé. Plusieurs récepteurs pour des facteurs de transcription ont été identifiés notamment les sites PU1, *activator protein 1* (AP-1), NF-κB, *secretory protein 1* (SP-1) et NF-IL6. Le site NF-κB est fonctionnellement actif en réponse à une stimulation par l'IL-1β ou le TNF-α tandis que les sites AP-1 et SP1 ne semblent pas jouer un rôle majeur en terme de réponse aux cytokines. Cependant, un autre mécanisme a été démontré dans la régulation de l'expression de PTX3 dans les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques du poumon humain (Han *et al.*, 2005). Dans ces cellules, le blocage du site NF-κB

n'abolit pas l'induction de PTX3 par le TNF- α . C'est le site c-Jun N-terminal kinase (JNK) qui est impliqué. En accord avec ces résultats, il a récemment été démontré que les glucocorticoïdes (GCs), qui jouent un rôle complexe dans la régulation des composants de l'immunité innée et adaptative, ont des effets sur l'expression de PTX3 qui diffèrent dans les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques (Doni et al, 2008). Les GCs inhibent la production de PTX3 dans les CD myéloïdes tandis qu'ils l'activent dans les fibroblastes et les cellules endothéliales. Cet effet s'observe aussi bien avec les GCs exogènes qu'endogènes, les patients souffrant de Cushing présentant un niveau de PTX3 sérique plus élevé.

1.3.5. Ligands de PTX3

PTX3, libérée par les neutrophiles ou produite par les CD et les monocytes suite à un challenge microbien, est capable de se lier à des antigènes bien spécifiques, *fungi*, bactérie ou virus (Figure 12). Elle promeut alors la phagocytose et donc l'élimination du pathogène. PTX3 se lie notamment de manière spécifique aux pathogènes suivants: les conidies d'*A. fumigatus* (Garlanda et al., 2002), *Paracoccidoides brasiliensis* et le zymosan (Diniz et al., 2004), les bactéries gram positives et négatives (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria meningitides*, *Klebsiella pneumoniae* (Garlanda et al., 2002; Jeannin et al., 2005) et certaines souches virales telles que les cytomégalovirus humain et murin et le virus influenza de type A (Bozza et al., 2006; Reading et al., 2008). Les macrophages de souris transgéniques qui surexpriment PTX3 ont un index phagocytaire plus élevé de *Paracoccidoides brasiliensis* que ceux de souris sauvages. Par ailleurs, l'administration de PTX3 exogène entraîne une augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages des souris sauvages (Diniz et al., 2004). Ces résultats confirment la capacité de PTX3 à agir comme une opsonine. Il a en outre été démontré que les souris transgéniques pour PTX3 surexprimaient les récepteurs dectin-1 et TLR2; ceux-ci étant impliqués respectivement

dans l'initiation et l'activation de la cascade pro-inflammatoire (Gantner *et al.*, 2003; Willment et Brown, 2008).

PTX3 est également impliquée dans la modulation de l'activation du complément (Figure 12). PTX3 se lie en effet au premier composant de la voie classique d'activation du complément (C1q). Contrairement aux pentraxines classiques, PTX3 interagit avec C1q de manière calcium-indépendante, sans agrégation préalable de la protéine. L'interaction de PTX3 et C1q résulte en l'activation de la voie classique du complément lorsque C1q est plastiquement immobilisé (Inforzato *et al.*, 2006). En revanche, lorsque C1q est sous forme soluble et qu'il se lie à PTX3, cela résulte en l'inactivation de la voie classique comme sous l'effet d'une compétition inhibitrice (Nauta *et al.*, 2003). PTX3 interagit également avec le facteur H, un régulateur majeur de la voie alterne du complément (Zipfel *et al.*, 2008). La déposition du facteur H est stimulée sur les surfaces couvertes de PTX3, ce qui prévient une stimulation excessive de la cascade du complément (Deban *et al.*, 2008).

PTX3 se lie par ailleurs aux cellules apoptotiques, inhibant leur reconnaissance par les CD (Rovere *et al.*, 2000). Cette reconnaissance intervient tardivement dans l'apoptose et, contrairement aux pentraxines classiques, intervient là aussi de manière calcium-indépendante. L'activité de PTX3 varie en fonction de la forme dans laquelle elle se trouve. Sous forme déglycosylée, elle se lie et active le complément de manière plus efficiente (Inforzato *et al.*, 2006). En revanche, l'activité antivirale de PTX3 se manifeste sous sa forme sialylée (Reading *et al.*, 2008).

1.3.6. Rôle de PTX3 dans l'inflammation

PTX3 se comporte comme une protéine de la phase aigüe de l'inflammation. En effet, son niveau, bas en conditions normales (< 25 ng/ml chez la souris, < 2 ng/ml chez l'homme) augmente rapidement et de façon importante lors de choc endotoxinique ou septicémique mais aussi lorsque toutes sortes de conditions infectieuses ou inflammatoires sont rencontrées. Le pic en PTX3 circulant est atteint en six à huit heures avec des valeurs allant jusqu'à 800 ng/ml chez l'homme comme chez la souris. Les données collectées dans différentes pathologies indiquent une corrélation entre les niveaux de PTX3 plasmatique et la sévérité de la maladie, suggérant un rôle potentiel de PTX3 comme marqueur diagnostique et pronostique de l'inflammation. Il reste à déterminer si la corrélation entre le niveau de PTX3 circulant et la pathogénie est associée à un rôle de PTX3 dans la pathogénie des dommages, par exemple via l'amplification des cascades du complément et de la coagulation (Bottazzi *et al.*, 1997; Nauta *et al.*, 2003; Napoleone *et al.*, 2002 et 2004).

Le rôle de PTX3 dans la régulation de l'inflammation *in-vivo* a été investigué grâce à des modèles de souris transgéniques surexprimant PTX3 ou, au contraire, déficientes en PTX3. Dans un modèle de toxicité au LPS et de ligature/ponction du caecum, la surexpression de PTX3 conférait une résistance accrue aux souris transgéniques tandis que la déficience en PTX3 n'avait pas d'incidence (Garlanda *et al.*, 2002). A l'inverse, à la suite d'une atteinte de l'intestin par ischémie-reperfusion, les souris qui surexprimaient PTX3 ont développé une réaction inflammatoire exagérée et leur taux de survie a été réduit (Souza *et al.*, 2002). En effet, PTX3 stimule la production de médiateurs de l'inflammation par l'organisme tels que l'oxyde nitrique (NO) et le TNF- α ce qui se traduit par un effet pro-inflammatoire, lequel sera dans certains cas favorable à la survie de l'organisme et dans d'autres cas délétère.

Un exemple supplémentaire de la dualité d'action de PTX3 est donné par l'implication de celle-ci dans la résistance à l'infection pulmonaire par *Klebsiella pneumoniae* chez des souris transgéniques (Soares *et al.*, 2006). Lorsque les souris transgéniques (avec plusieurs copies du gène codant pour *PTX3*) reçoivent un inoculum élevé de bactéries, elles meurent plus vite et la dissémination bactérienne dans le sang est accrue par comparaison aux souris sauvages. Une explication à cette dualité serait qu'en contrôlant la production de NO et de TNF- α , et selon que l'inflammation est modérée ou marquée, l'expression de PTX3 favorise ou prévient l'afflux neutrophilique et subséquemment la capacité des souris à gérer l'infection.

PTX3 active également l'amplification de la réponse inflammatoire lorsqu'elle interagit avec le ligand bactérien OMP-A. Elle active le recrutement cellulaire et le niveau des cytokines inflammatoires (Jeannin *et al.*, 2005; Cotena *et al.*, 2007). Cet effet est démontré par le fait que la réponse inflammatoire à l'OMP-A est significativement diminuée chez les souris déficientes en PTX3 et qu'elle est restaurée par l'administration de PTX3 exogène chez ces mêmes souris. Dans ce cas, PTX3 amplifie la réponse innée en activant le complément indépendamment de la voie classique (Cotena *et al.*, 2007).

Mais PTX3 n'est pas pro-inflammatoire dans tous les cas. Notamment, lors d'inflammation non-septique, par exemple lors d'infarctus aigu du myocarde, il a été démontré qu'une déficience en PTX3 entraînait une réaction inflammatoire et des dommages plus importants, PTX3 ayant ici un rôle cardio-protecteur. PTX3 aurait donc un rôle et des effets duels dans la modulation des voies classique et alterne du complément (Cotena *et al.*, 2007; Bottazzi *et al.*, 1997). Un rôle protecteur comparable a été suggéré au niveau du système nerveux (Souza *et al.*, 2002).

1.3.7. PTX3: Le cas particulier d'*Aspergillus fumigatus*

In-vitro, les conidies d'*A. fumigatus* induisent rapidement la production de PTX3 par les macrophages et CDs. PTX3 se lie aux conidies du pathogène opportuniste (mais pas aux hyphes). En se liant aux conidies, PTX3 facilite l'internalisation et l'inactivation des conidies et induit la production de la *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1 ou CCL2) par les macrophages. *In-vivo*, les patients humains et les souris infectés par *A. fumigatus* présentent des niveaux de PTX3 plasmatique augmentés (Garlanda *et al.*, 2002). Les souris *knock-out* (KO) pour PTX3 sont extrêmement susceptibles à l'aspergillose pulmonaire invasive. L'administration de PTX3 recombinant à ces souris a un effet protecteur complet (Gaziano *et al.*, 2004). On a constaté chez ces souris KO, incapables de reconnaître les conidies d'*A. fumigatus*, un profil cytokinique inapproprié orienté vers une réponse TH2 plutôt que vers la réponse protectrice appropriée TH1. PTX3 apparaît ainsi comme essentielle pour l'activation d'une réponse immune polarisée de type 1 contre *A. fumigatus* (Garlanda *et al.*, 2002). Dans ce contexte, le rôle joué par PTX3 dans le développement d'une réponse TH2 inappropriée mérite d'être étudié dans l'aspergillose bronchopulmonaire allergique.

1.3.8. Autres rôles de PTX3 (fertilité et activité anti-angiogénique)

PTX3 apparaît comme indispensable à la reproduction. En effet, les souris KO pour PTX3 sont sévèrement infertiles (Garlanda *et al.*, 2002; Varani *et al.*, 2002). Cette infertilité est associée à un *cumulus oophorus* anormal, caractérisé par une matrice extracellulaire instable dans laquelle les cellules du cumulus sont uniformément dispersées au lieu d'irradier à partir de l'oocyte central (Salustri *et al.*, 2004). PTX3 est exprimée dans l'ovaire des souris durant la période pré-ovulatoire en parallèle à la déposition de matrice par les cellules du cumulus. En se liant au *TNF- α -induced protein 6* (TSG-6), PTX3 agit comme un point d'ancrage pour la matrice

extracellulaire riche en acide hyaluronique (Salustri *et al.*, 2004), laquelle est essentielle pour la fertilité. Par ailleurs, PTX3, contenue dans la matrice du *cumulus oophorus*, dirige l'adhésion et la direction des spermatozoïdes, facilitant ainsi le processus de fertilisation (Salustri *et al.*, 2004).

PTX3 se lie également au *fibroblast growth factor 2* (FGF2) avec pour effet le blocage de l'activité angiogénique du FGF2, *in-vivo* et *in-vitro* (Rusnati *et al.*, 2004).

Ainsi, outre son implication dans l'immunité humorale innée, PTX3 exerce également un rôle essentiel dans la fertilité et des fonctions anti-angiogéniques. Ces fonctions ne font pas l'objet du présent travail et ne seront donc pas détaillées.

1.3.7. Conclusions

PTX3 est une protéine de l'inflammation récemment découverte et qui n'a jamais été étudiée chez le cheval.

Elle intervient dans la réponse immune innée. Elle agit comme un ancêtre fonctionnel des anticorps. En effet, elle reconnaît les microbes, active le complément et facilite la reconnaissance de certains pathogènes par les phagocytes, jouant ainsi un rôle dans la résistance contre ces pathogènes et, en particulier, contre le champignon pathogène opportuniste *A. fumigatus* (Garlanda *et al.*, 2002, Gaziano *et al.*, 2004). Or, ce dernier est l'un des trois actinomycètes majeurs présents dans les fourrages et impliqués dans l'ORVR. La régulation de l'expression de PTX3 dans les macrophages et les cellules dendritiques (CDs) suggère que cette molécule est impliquée dans un mécanisme d'amplification de la résistance innée contre les pathogènes, agissant principalement au site de l'inflammation. Selon les circonstances, PTX3 peut ainsi augmenter la survie (Garlanda *et al.*, 2002) ou au contraire

augmenter la mortalité lorsque la réponse inflammatoire devient excessive (Soares *et al.*, 2006). Dans les cas d'ORVR, la réponse inflammatoire est excessive et inappropriée, à composante majoritairement neutrophilique. La question qui se pose est de savoir si cette réaction excessive est associée à une variation d'expression de PTX3.

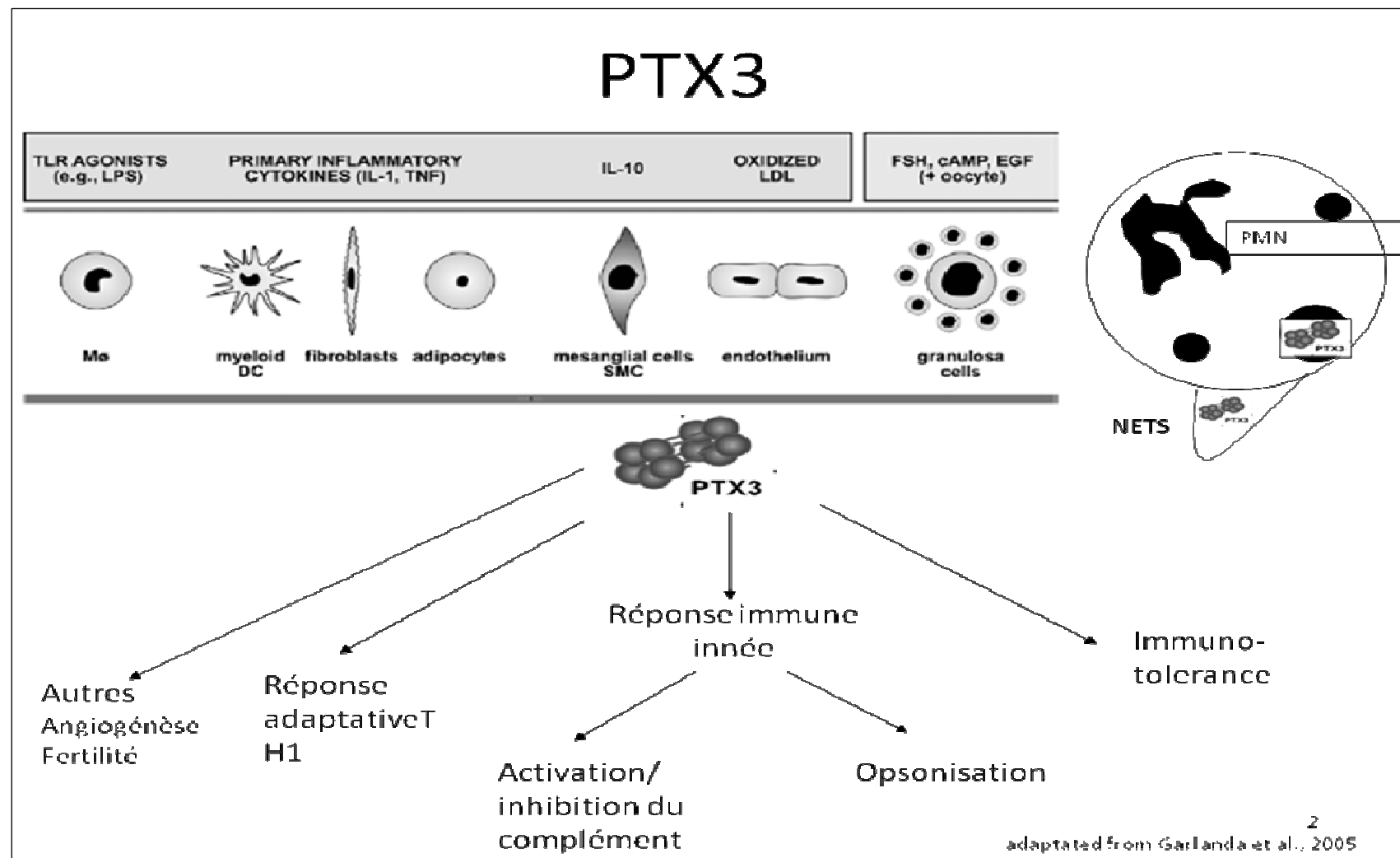


Figure 12: Induction, production et fonction de PTX3.

2. Objectifs du travail

Alors que l'ORVR est une entité documentée dans la littérature depuis plus de 200 ans, les mécanismes moléculaires qui la sous-tendent restent incomplètement élucidés à ce jour. Une explication possible serait l'existence d'intervenants ignorés dans la pathogénie de la maladie. La technologie des microdamiers d'expression a pu voir le jour grâce aux progrès conjoints de la connaissance des génomes et des capacités de miniaturisation et de traitement/analyse d'un grand nombre de données. Ils permettent entre autres, en investiguant l'ensemble du génome, de mettre au jour de nouveaux candidats dans l'élucidation des mécanismes qui sous-tendent les maladies, et de mieux comprendre comment les différents intervenants d'une même maladie sont co-régulés. A l'heure où cette étude a débuté, aucun microdamier d'expression spécifiquement dédié au cheval n'était disponible sur le marché.

Le premier objectif de ce travail a été d'identifier de nouveaux gènes d'intérêt pour comprendre la pathogénie de l'ORVR chez le cheval en utilisant un microdamier hétérologue humain. Les résultats ont été validés par RT-qPCR.

Le second objectif a été de caractériser une de ces molécules d'intérêt, à savoir PTX3, dans l'espèce équine et d'évaluer son expression par les cellules des voies respiratoires en réponse à des poussières de foin, chez le cheval sain et le cheval atteint d'ORVR, *in-vivo* et *ex-vivo*.

3. Présentation synoptique des résultats

3.1. Etude 1: Utilisation d'un microdamier humain associé à la RT-qPCR pour identifier de nouveaux gènes d'intérêt chez les chevaux atteints d'ORVR

Relevance of using a human microarray to study gene expression in heaves-affected horses. Ramery E, Closset R, Bureau F, Art T, Lekeux P. Vet J. 2008, 177, 216-21.

L'ORVR est la cause la plus fréquente de maladie pulmonaire chronique chez le cheval adulte. Les mécanismes moléculaires qui la sous-tendent restent incomplètement élucidés à ce jour. Une explication possible serait l'existence d'intervenants ignorés dans la pathogénie de la maladie. Connaître l'expression des gènes associés devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'ORVR. La technologie des microdamiers permet en investiguant l'ensemble du génome, de mettre au jour de nouveaux candidats dans l'élucidation des mécanismes qui sous-tendent les maladies et de mieux comprendre comment les différents intervenants d'une même maladie sont co-régulés. A l'heure où cette étude a débuté, il n'existait pas de microdamier d'expression spécifiquement dédié au cheval sur le marché. Un microdamier hétérologue humain a donc été utilisé.

Six chevaux sains et six chevaux atteints d'ORVR en crise ont été étudiés via des tests cliniques, fonctionnels et biochimiques. Un score clinique a été attribué à chaque cheval d'après la méthode décrite par Rush et collaborateurs (1998). Les paramètres fonctionnels (résistance et réactance) des voies respiratoires ont été mesurés par la technique d'oscillométrie par impulsions (IOS) validée pour le cheval (Van Erck *et al.*, 2004), les gaz sanguins artériels ont été mesurés, et une numération formulaire a été réalisée sur le LBA.

Dans la première partie de cette étude, un microdamier a été utilisé pour mesurer l'expression génique et dans la seconde partie, la RT-qPCR a été utilisée pour confirmer les résultats obtenus à l'aide du microdamier.

3.1.1. Partie1: Mesure de l'expression génique par microdamier

L'ARN des cellules nucléées isolées du LBA et des cellules nucléées du sang des chevaux a été extrait (kits Qiagen Rneasy[®]) et sa qualité testée (Nanodrop[®], bioanalyseur Agilent[®]). Quatre pools ont été constitués: un pool d'ARN provenant des cellules nucléées du sang des chevaux sains, un pool d'ARN provenant des cellules nucléées du sang des chevaux atteints, un pool d'ARN provenant des cellules nucléées du LBA des chevaux sains, un pool d'ARN provenant des cellules nucléées du LBA des chevaux atteints. Chaque pool a été hybridé à un microdamier hétérologue humain *Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip* (Affymetrix[®], Figure 13) suivant la technique d'hybridation monocolore. Un échantillon d'ARN propre à chaque cheval a été conservé en vue des RT-qPCR de contrôle.

Les microdamiers ont détecté 46 gènes dont l'expression variait d'un facteur supérieur à 4 entre chevaux sains et atteints. Parmi ceux-ci, trois gènes présentaient un intérêt particulier au regard de la littérature: *CYBB*, *MARCKS* et *PTX3*. *PTX3* était surexprimé et *MARCKS* était sous exprimé dans le LBA des chevaux atteints d'ORVR; *CYBB* était sous exprimé dans le sang des chevaux atteints d'ORVR. En revanche, certains gènes tels que l'*IL-1 β* et l'*IL-8*, attendus suite à la revue de littérature, n'étaient pas détectés par le microdamier.

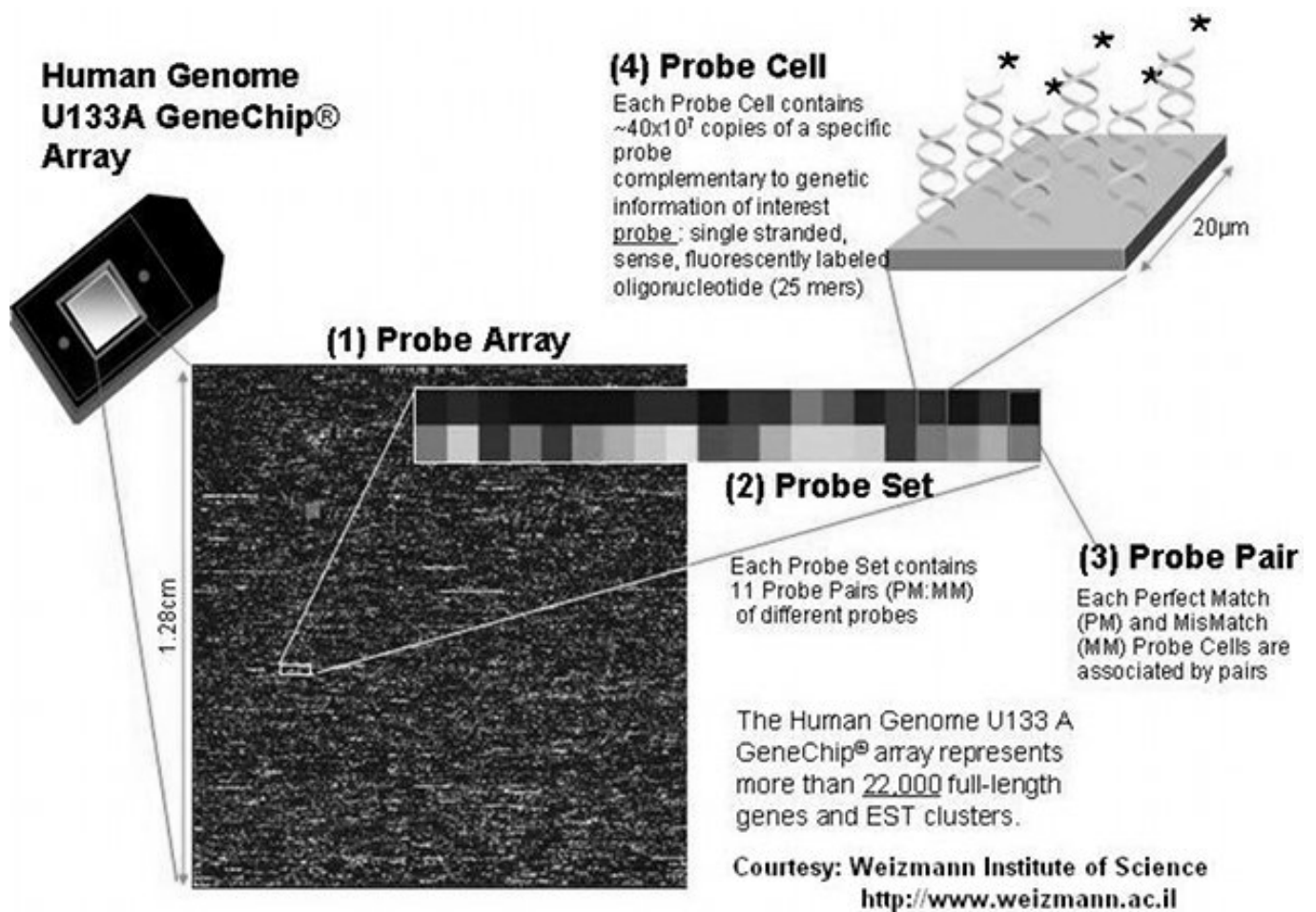


Figure 13: Présentation schématique des caractéristiques du microdamier *Human Genome U133A GeneChip®*.

3.1.2. Partie 2: Mesure de l'expression génique par RT-qPCR

L'expression des gènes *MARCKS*, *CYBB*, *PTX3*, *IL-1β* et *IL-8* a été mesurée dans les cellules nucléées du sang et du LBA par RT-qPCR. Les cinq gènes étaient exprimés dans le sang et dans le LBA, y compris l'*IL-1β* et l'*IL-8*. L'*IL-1β* et l'*IL-8* présentaient par ailleurs une surexpression marquée dans le LBA. Ces résultats montrent que des gènes exprimés n'ont pas été détectés par le microdamier.

En revanche, la RT-qPCR a confirmé les variations d'expression mises en avant par le microdamier pour les gènes d'intérêt *CYBB*, *MARCKS* et *PTX3*. De manière intéressante, l'étude par RT-qPCR a montré une variation dans le même sens de l'expression de ces trois gènes dans le LBA et dans le sang (Figure 14). Cette variation était quantitativement similaire dans le LBA et le sang pour *CYBB* et *MARCKS* mais elle était beaucoup plus importante dans le LBA pour *PTX3* (Figure 14).

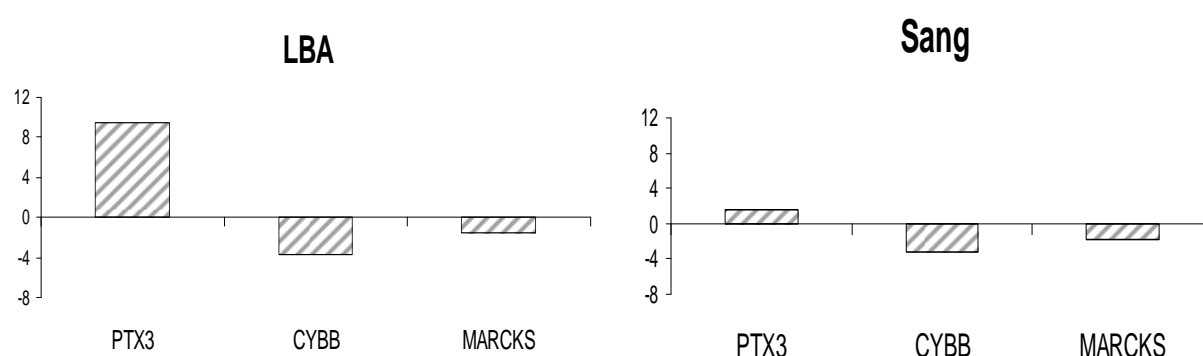


Figure 14: Variations d'expression mesurées par RT-qPCR chez les chevaux atteints d'ORVR comparés aux chevaux sains.

3.1.3. Conclusion de la première étude

Ces résultats montrent que le microdamier est un outil d'investigation intéressant puisqu'il a permis de mettre en avant des gènes non étudiés à ce jour dans l'espèce équine et qui pourraient se révéler des pistes intéressantes pour une meilleure compréhension de l'ORVR. *PTX3* notamment appartient à la composante humorale de la réponse immunitaire innée. Cette molécule possède une activité antimicrobienne dirigée spécifiquement contre certains pathogènes dont *A. fumigatus*. La seconde étude s'est donc focalisée sur *PTX3*.

3.2. Etude 2: Caractérisation de la Pentraxine 3 et de son expression dans les voies respiratoires chez le cheval

Characterization of pentraxin 3 in the horse and its expression in airways. Ramery E, Fievez L, Fraipont A, Bureau F, Lekeux P. Vet Res. 2010, 41,18. Epub 2009 Oct 29.

PTX3 est une protéine de la phase aigüe de l'inflammation récemment découverte qui serait également impliquée dans la persistance de l'inflammation et la mise en place de lésions chroniques (van Rossum *et al.*, 2006; Savchenko *et al.*, 2008) (Figure 15). Par ailleurs, Garlanda et collaborateurs (2002) ont les premiers mis en évidence un rôle de PTX3 dans la résistance à l'aspergillose. Or, *A. fumigatus* ferait partie des agents causatifs de l'ORVR (Pirie *et al.*, 2003).

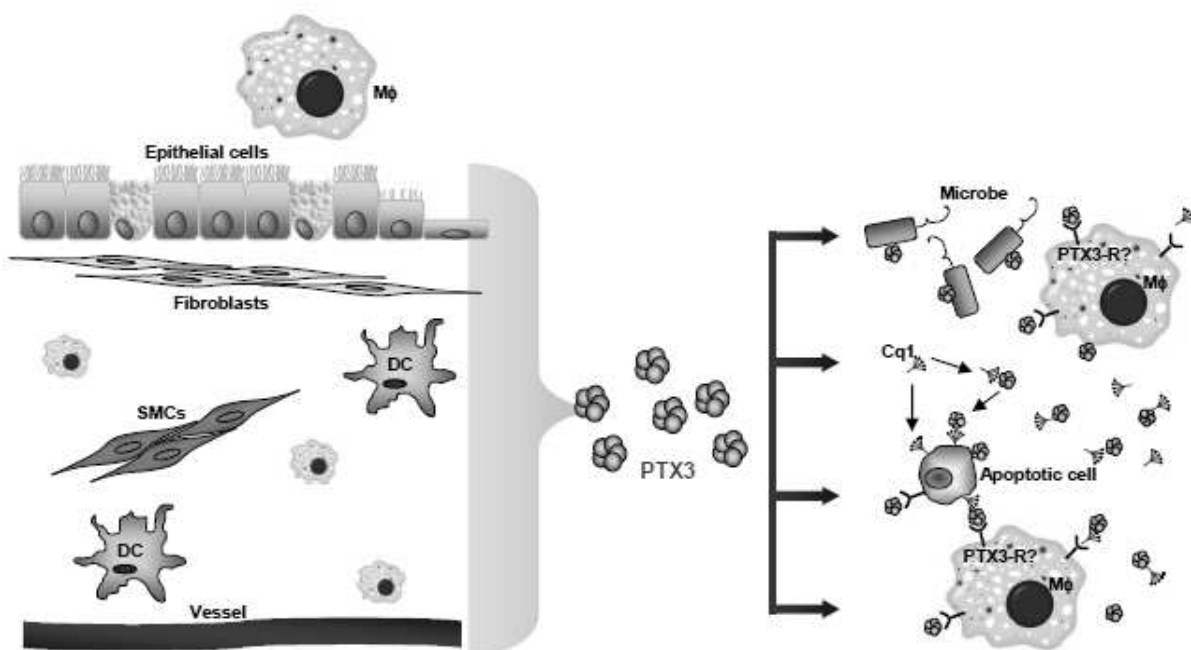


Figure 15: Production locale et fonction de PTX3 dans l'immunité et l'inflammation. PTX3 est produite par de nombreux types cellulaires. Elle se lie spécifiquement à certains pathogènes (fungi, bactéries et virus), à C1q et aux cellules apoptotiques et amplifie la production d'oxyde nitrique et de cytokines par les macrophages (He *et al.*, 2008).

3.2.1. Partie 1: Caractérisation de PTX3

Afin de caractériser PTX3 dans l'espèce équine, de l'ARN, de l'ADN et les protéines totales ont été extraits à partir de cellules nucléées isolées du sang périphérique d'un cheval sain. Une RT-PCR a été réalisée à partir de l'ARN, une PCR à partir de l'ADN et un Western Blot à partir des protéines totales. L'ADNc de *PTX3* et l'ADN du second exon de *PTX3* ont été clonés et séquencés.

L'ADNc de *PTX3* était proche de celui de l'homme et de la souris pour les exons 1 et 3. Un BLASTX obtenu à partir de la séquence de l'ADNc a permis de montrer que la portion C-terminale "pentraxin-like"(exon 3) chez le cheval contient bien la signature canonique des pentraxines (HxCxS/TWxS/T) et montre une identité de 88% avec la séquence humaine (Figure 16). En outre, les sites de glycosylation de la protéine prédite sont préservés. En revanche, le second exon de *PTX3* était absent de la séquence d'ADNc. L'ADN du second exon de *PTX3* présentait une délétion de 120 paires de bases.

Un modèle tridimensionnel du domaine pentraxine de la PTX3 équine a été généré (Figure 17) grâce au programme *Swiss Prot d'Expasy* (<http://www.expasy.ch/>). Il présente une forte homologie avec la structure du crystal de haute résolution obtenu pour la SAP humaine.

Un anticorps monoclonal anti-PTX3 humain, dirigé contre la partie protéique C-terminale, hautement conservée entre le cheval et l'homme, a été utilisé pour détecter la protéine équine par Western Blot et pour les immuno-histochimies ultérieures.

Le western-blot révélait deux bandes à 32 et 42 kilodaltons (kDa), poids moléculaires prédits après glycosylation de la protéine complète et de la protéine épissée pour le second exon respectivement.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment Equus vs Homo

```

PTX3_GUE      MHLPAILFCVLWSVVSAAENSDDYELMYVNLNDNEIDNGLHPTEDR----- 44
ptx3_H        MHLAILFCALWSAVLAENSDDYDLMYVNLNDNEIDNGLHPTEDPTPCDCRQEHSEWDKLF 60
               ***  *****.***.* *****;*****

PTX3_GUE      -----
ptx3_H        TMLENSQMREGMLLQATDDVLRGELQRLREELGRLAESLARPCEQGALAEAKLASALDEL 120

PTX3_GUE      -----CE 46
ptx3_H        LQASRDAGRRLERLEGAETQRPPEAGRALAAMLEELRQTRADLHAVQGWAARTWLPAGCD 180
               *;

PTX3_GUE      TAVLFPMRSKKIFGVSHPARPLRLESFSACIWKATDVLNKTILFSYGTKRNPYEIQLYL 106
ptx3_H        TAILFPMRSKKIFGVSHPVRPMRLESFSACIWKATDVLNKTILFSYGTKRNPYEIQLYL 240
               **;*****.***;*****

PTX3_GUE      SSQSIVFVVGGEESKLVADTVVSLGRWTHLCSTWNSEKGRSLWVDGELVASTVEMATGH 166
ptx3_H        SYQSIVFVVGGEENKLVAETMVSLGRWTHLCGTWNSEKGLTSLWVNGELVATTVEMATGH 300
               * *****.***;* ***** *****;*****;*****

PTX3_GUE      VVPEGGILQIGQEKNCCVGGGFDETLAFSGRLTGFNIWDHVLNSEEIRETGGAESCHIR 226
ptx3_H        TVPEGGILQIGQEKNCCVGGGFDETLAFSGRLTGFNIWDSVLSNSEEIRETGGAESCHIR 360
               .*****

PTX3_GUE      GNVVGWGVTEIQPHGGAQYVS 247
ptx3_H        GNIVGWGVTEIQPHGGAQYVS 381
               **;*****

```

Figure 16: Analyse de l'alignement des acides aminés de PTX3 sous sa forme épissée chez le cheval (PTX3_GUE) et chez l'homme (PTX3_H). La signature canonique des pentraxines (HxCxS/TWxS/T) est entourée. "*" indique que les résidus sont identiques, ":" indique une substitution conservative, "." indique une substitution semi-conservative.



Figure 17: Conformation tridimensionnelle du domaine pentraxine de la PTX3 équine.

3.2.2. Partie 2: Expression de PTX3 en réponse à des poussières de foin *in-vivo*

Afin d'étudier l'expression de PTX3 dans les voies respiratoires de chevaux soumis à des poussières de foin, six chevaux sains et six chevaux atteints d'ORVR ont été soumis pendant dix jours à un challenge environnemental aux poussières de foin. Les chevaux ont été étudiés via des tests cliniques, fonctionnels et biochimiques (score clinique, IOS, score endoscopique, comptage cellulaire dans le LBA, hématologie, gaz sanguins) au début et à la fin du protocole.

A la suite de ce challenge, les chevaux atteints d'ORVR ont développé une crise caractéristique de la maladie. Les chevaux sains n'ont pas développé de signes cliniques mais le nombre et la proportion de macrophages dans leur LBA a augmenté. Les macrophages des chevaux sains exposés aux poussières de foin présentaient en outre des modifications morphologiques avec notamment une vacuolisation plus importante et une grande quantité de débris poussiéreux dans leur cytoplasme. Il semblerait donc que les chevaux sains développent eux aussi une réaction à l'exposition aux poussières de foin (Figure 18).

Les LBA ont été récoltés lors de l'initiation du protocole et après les dix jours d'exposition aux poussières de foin. Par ailleurs, des sections bronchiques ont été réalisées chez deux chevaux atteints d'ORVR en crise et euthanasiés pour raisons éthiques et deux chevaux indemnes d'affections respiratoires provenant de l'abattoir.

Les cytopspins, réalisés à partir des LBA, ont montré, grâce à l'immuno-histochimie, que PTX3 était faiblement décelable à indécélable dans les cellules du LBA lorsque les chevaux se trouvaient dans un environnement dépoussiéré. Après dix jours d'exposition aux poussières de foin, PTX3 se retrouvait principalement dans les macrophages du LBA et dans une moindre

mesure dans les neutrophiles jeunes en cours de segmentation. Le signal immuno-histochimique était plus marqué chez les chevaux atteints d'ORVR que chez les chevaux sains. PTX3 n'était pas détectée dans les neutrophiles segmentés ni dans les lymphocytes.

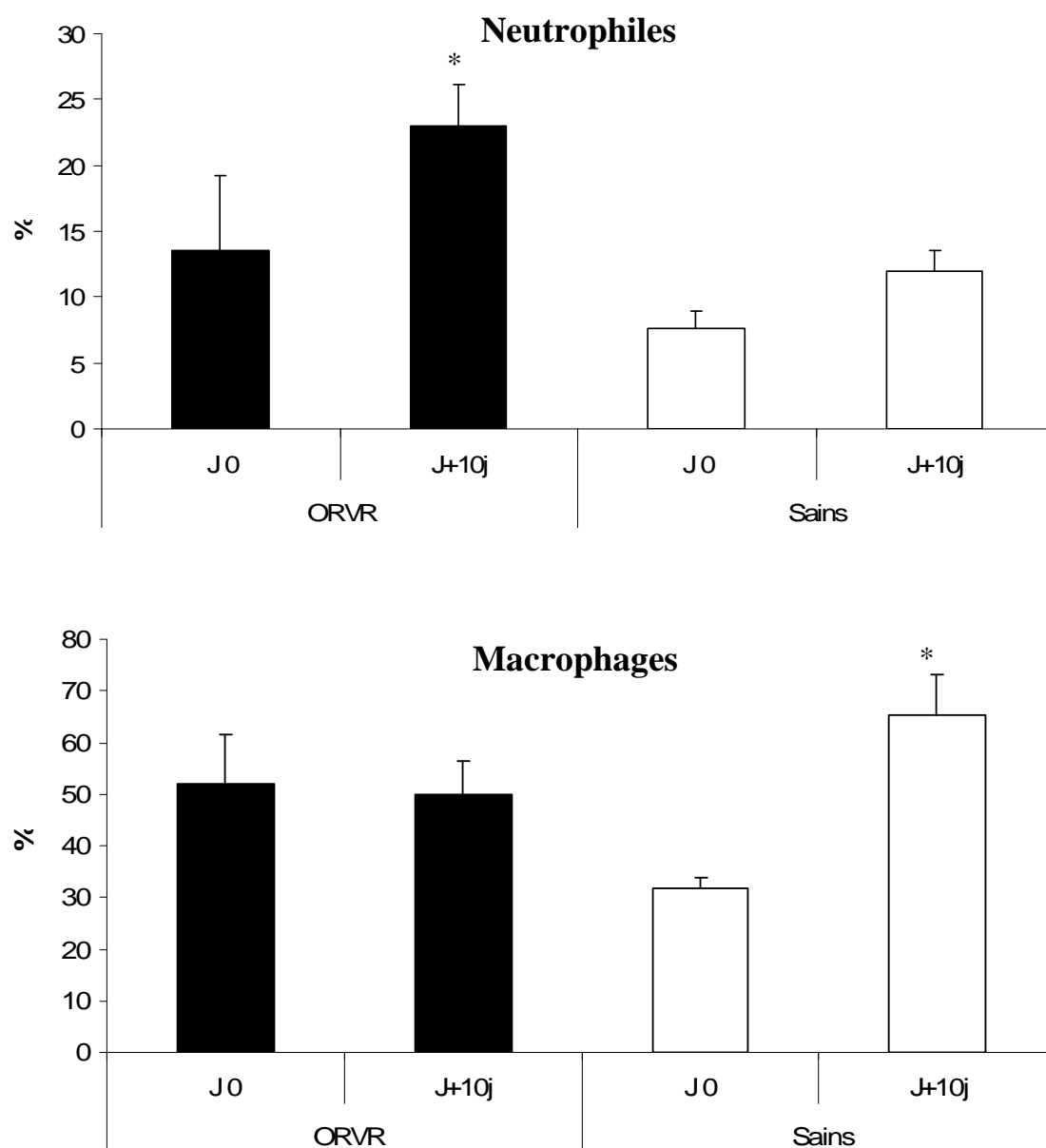


Figure 18: Résultats des numérations formulaires de lavage broncho-alvéolaire

*différence significative ($P < 0,05$) entre J0 et J+10j au sein d'un même groupe.

Dans les sections bronchiques, PTX3 était constitutivement exprimée et se localisait à l'apex des cellules épithéliales bronchiques, sous les processus ciliés, et dans les cellules inflammatoires infiltrantes. Le signal immuno-histochimique était plus marqué chez les chevaux atteints d'ORVR en crise que chez les chevaux sains. Une RT-qPCR réalisée sur les macrophages du LBA a montré que *PTX3* était surexprimée après dix jours d'exposition aux poussières de foin mais qu'il n'y avait pas de différence significative à ce niveau entre les chevaux sains et les chevaux atteints d'ORVR.

PTX3 est une protéine soluble. Afin d'évaluer sa libération globale au niveau des voies respiratoires, le surnageant des LBA a été recueilli, concentré dix fois et soumis à un Western Blot. Après dix jours d'exposition aux poussières de foin, le niveau de PTX3 était significativement supérieur chez les chevaux atteints d'ORVR que chez les chevaux sains.

3.2.3. Partie 3: Expression de PTX3 en réponse à différents constituants des poussières de foin *ex-vivo*

Afin de mieux comprendre la part de responsabilité des différents éléments présents dans les poussières de foin dans l'expression de PTX3, les cellules du LBA de trois chevaux sains et de trois chevaux atteints d'ORVR ont été soumises *ex-vivo* pendant six et vingt-quatre heures à différents stimuli, notamment trois solutions de poussières de foin de concentrations croissantes (C1: 1µg/ml, C2: 10µg/ml, C3: 100µg/ml), *A. fumigatus* lyophilisé (80 cfu/ml) et LPS (10µg/ml). Une solution saline tamponnée pour le phosphate a été utilisée comme contrôle. La présence de PTX3 a été mesurée par Western Blot six heures et vingt-quatre heures après le début des différentes stimulations dans les cellules et dans les surnageants respectivement.

PTX3 était détectée dans les cellules et dans les surnageants dans toutes les conditions mais aucune différence significative d'expression n'a pu être mise en évidence que ce soit entre les différents stimuli, entre les différents temps ou avec le contrôle. Ceci suggère que la poussière et ses différents constituants ne sont pas des inducteurs directs de PTX3.

3.2.4. Conclusions de la 2^{ème} étude

L'étude de la structure de PTX3 chez le cheval a montré que l'ADN du gène *PTX3* équin présente une délétion de 120 paires de bases au sein de son second exon par comparaison à l'ADN humain. Cette délétion se traduit par un épissage alternatif du second exon au niveau de l'ARNm et par la coexistence de deux formes de PTX3 (32 kDa et 42 kDa) au niveau protéique. Le protocole visant à étudier l'expression de PTX3 dans les voies respiratoires du cheval a mis en avant que l'exposition à des poussières de foin entraîne une réponse du système immunitaire et la surexpression de PTX3 dans les macrophages du LBA chez tous les chevaux. Cependant la réponse immunitaire diffère entre les chevaux sains et les chevaux atteints d'ORVR et le niveau de PTX3 présent dans le surnageant du LBA est plus élevé chez les chevaux atteints d'ORVR que chez les chevaux sains. Enfin, il semblerait que la poussière de foin soit un inducteur indirect de PTX3.

4. Discussion générale

Dans la première étude (Ramery *et al.*, 2008), le microdamier d'expression a permis d'identifier plusieurs gènes candidats pour une meilleure compréhension de la pathogénie de l'ORVR dont certains ont précédemment montré une implication dans l'asthme (*eg. MARCKS*) et d'autres maladies respiratoires (*eg. CYBB* et *PTX3*). La protéine MARCKS régule notamment l'exocytose du mucus (Rogers, 2003) et pourrait être impliquée dans les modifications des propriétés du mucus qui se manifestent lors d'ORVR. Le polypeptide CYBB joue un rôle dans la séquestration des neutrophiles dans le poumon (Gao *et al.*, 2002) et pourrait être partiellement responsable de l'afflux de neutrophiles dans le poumon des chevaux atteints d'ORVR. PTX3 appartient à la composante humorale de la réponse immune innée. Elle agit comme un ancêtre fonctionnel des anticorps. Elle reconnaît les microbes, active le complément et facilite la reconnaissance de certains pathogènes par les phagocytes, jouant ainsi un rôle dans la résistance contre ces pathogènes et, en particulier, contre le champignon pathogène opportuniste *A. fumigatus* (Garlanda *et al.*, 2002; Gaziano *et al.*, 2004). Ces gènes, dont l'expression est modulée lors d'inflammation respiratoire, n'avaient jamais été associés à l'ORVR et présentent donc le microdamier d'expression comme un outil prospectif de valeur dans l'espèce équine.

Les résultats de ce protocole ont également mis en avant les limites de l'utilisation d'un microdamier hétérologue humain dans l'espèce équine. En effet, certains gènes exprimés tels que l'*IL-1 β* et l'*IL-8* n'étaient pas détectés par le microdamier. De manière intéressante, aucune interleukine n'a été détectée par le microdamier. Un alignement des séquences d'*IL-1 β* et d'*IL-8* humaines et équines a permis de montrer que ces gènes ne présentaient pas une homologie suffisante entre les différentes espèces pour permettre une hybridation croisée. Par conséquent,

l'un des objectifs inhérents à l'utilisation des microdamiers d'expression à large échelle, à savoir l'étude simultanée de l'expression de tous les gènes dans une condition donnée, n'a pu être atteint.

De manière intéressante, l'étude de l'expression de *MARCKS*, *CYBB* et *PTX3* par RT-qPCR, a montré que ces trois gènes variaient dans le même sens dans le LBA et dans le sang. En revanche, si ces variations étaient quantitativement similaires dans le LBA et le sang pour *CYBB* et *MARCKS*, la variation d'expression de *PTX3* était beaucoup plus importante dans le LBA que dans le sang. Ceci supporte le fait que *PTX3* est une molécule locale de l'inflammation (Manfredi *et al.*, 2008). Cependant, cela suggère également qu'une surexpression locale de *PTX3* se reflète au niveau sanguin. Ensemble, ces différents résultats indiquent que *PTX3* pourrait être à la fois un marqueur local et systémique de l'inflammation.

La deuxième étude (Ramery *et al.*, 2010) a investigué la structure et l'expression de *PTX3*. Les pentraxines sont conservées dans l'évolution, probablement parce qu'elles confèrent un avantage sélectif. Pourtant, dans cette étude, une délétion de 120 paires de bases a été constatée dans la séquence génique du second exon de *PTX3*. Par ailleurs, un épissage alternatif du même exon a été mis en évidence. Ce résultat est supporté par le fait que la séquence épissée obtenue s'aligne parfaitement avec le clone cDNA LeukoN4_5_F08_A026 (Vandenplas, numéro d'accès: CD464905). Les fonctions de la partie amino-terminale, codée par l'exon 2, sont encore mal connues. Elle intervient dans la liaison à FGF2, qui est associée aux fonctions anti-angiogéniques de la protéine (Camoszi *et al.*, 2006), alors que c'est la partie carboxy-terminale qui intervient dans l'activation du complément (Inforzato *et al.*, 2006). L'existence des deux formes de la protéine chez le cheval offre d'intéressantes perspectives pour la compréhension des fonctions associées aux deux parties. L'existence de la délétion de 120

paires de base au sein de l'exon 2 pourrait par exemple être impliquée dans les désordres cicatriciels fréquents chez le cheval et notamment la formation de chéloïdes.

Même s'ils ne montraient pas de signes cliniques, les chevaux sains ont développé eux aussi une réaction inflammatoire. Certains experts de l'ORVR s'accordent à reconnaître une superposition au moins partielle entre les formes les moins sévères d'ORVR et les formes les plus sévères d'inflammation des voies respiratoires non-allergiques (Robinson, 2006; Pirie, 2008). Ainsi, une étude a montré que, bien qu'ils ne présentent pas de signes cliniques d'obstruction des voies respiratoires ou de production exacerbée de mucus, les chevaux sains placés dans le même environnement que les chevaux atteints d'ORVR présentent une augmentation significative des neutrophiles dans le LBA, même si cette augmentation est plus faible chez les chevaux sains que chez les chevaux atteints d'ORVR (Robinson, 2006). Sur le plan anatomo-pathologique, les chevaux sains et atteints d'ORVR soumis au même environnement ne présentent d'ailleurs pas de variation significative dans la sévérité de l'inflammation bronchiolaire, l'hyperplasie épithéliale et la métaplasie des cellules à mucus. La quantité de mucus dans les cellules à mucus et le nombre de cellules épithéliales dans les voies respiratoires terminales ne sont pas non plus significativement différents (Lugo *et al.*, 2006). Ces résultats amènent la question de savoir si l'IAD qui se développe chez les chevaux adultes, sans détresse respiratoire au repos, et exposés à un environnement poussiéreux, ne serait pas une forme précoce d'ORVR.

Les chevaux sains présentaient, après l'exposition aux poussières de foin, une augmentation de la proportion de macrophages dans le LBA ainsi qu'une modification de la morphologie de ces derniers. De manière intéressante, ces modifications n'étaient pas observées chez les chevaux atteints d'ORVR soumis au même challenge. D'autres équipes ont noté un comportement

différent des macrophages chez les chevaux sains et les chevaux atteints d'ORVR. En 1993, Tremblay et collaborateurs remarquaient que les macrophages du LBA de chevaux atteints d'ORVR et sains soumis à un challenge se retrouvaient dans des gradients de Percoll différents. Franchini et collaborateurs (1998) ont noté, par comparaison aux chevaux sains, une déficience de la phagocytose des macrophages du LBA des chevaux atteints d'ORVR associée à une augmentation de l'activité chimiotactique. Enfin, Laan et collaborateurs (2005 et 2006) ont suggéré une implication possible des macrophages dans la pathogénie de l'ORVR.

Les macrophages constituent, avec les neutrophiles, la première ligne de défense des voies respiratoires contre les agents extérieurs (Holt *et al.*, 2008). À l'état basal, la fonction première des macrophages est la phagocytose et la séquestration des antigènes inoffensifs ce qui prévient le développement de réponses immunes adaptatives inappropriées (Mac Lean *et al.*, 1996). Dans les conditions homéostatiques, l'adhésion des macrophages alvéolaires aux cellules épithéliales se traduit par la suppression de la production cytokinique des macrophages (Munger *et al.*, 1999). Ce mécanisme semble spécifique au poumon et illustre la spécificité de l'activité macrophagique au sein de ce tissu. Le turnover de la population de macrophages alvéolaires est normalement très lent comparé à celui des cellules dendritiques adjacentes. À l'état basal les macrophages alvéolaires sont largement renouvelés par la prolifération des précurseurs locaux mais lors d'une inflammation le renouvellement est essentiellement assuré par l'arrivée de monocytes (Winter *et al.*, 2007). Or, le phénotype fonctionnel des monocytes récemment recrutés contraste de façon marquante avec celui des macrophages alvéolaires résidents. En effet, avant leur maturation en macrophages alvéolaires immunosuppresseurs, les monocytes peuvent fonctionner comme cellules présentatrices d'anticorps (Bilyk *et al.*, 1995). La maturation survient après une période de quelques jours ce qui ouvre une fenêtre temporelle pour activer les cellules T présentes dans le poumon périphérique (Bilyk *et al.*, 1993).

Ainsi, le recrutement des macrophages, leur production accrue de PTX3 et leur morphologie pourraient être la réaction de défense normale de l'organisme. L'ORVR serait alors le reflet de la déficience de cette réaction et l'afflux neutrophilique serait lié à un échec des macrophages à séquestrer efficacement les antigènes environnementaux et ainsi prévenir le développement de réponses immunes adaptatives inappropriées (Mac Lean *et al.*, 1996).

PTX3 était surexprimée dans les macrophages du LBA chez tous les chevaux après dix jours d'exposition aux poussières de foin. Cependant, le niveau de PTX3 était plus élevé dans le surnageant du LBA des chevaux atteints d'ORVR que dans celui des chevaux sains. Différentes hypothèses pourraient expliquer cette situation. D'une part, il est possible que les valeurs plus élevées de PTX3 observées dans les tissus et les liquides physiologiques lors d'inflammation reflètent davantage un nombre élevé de cellules inflammatoires actives qu'une surexpression de PTX3 par ces cellules (Kato *et al.*, 2008; Malaponte *et al.*, 2007; Okutani *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2001; Polentarutti *et al.*, 2000). D'autre part, les neutrophiles, particulièrement nombreux dans le poumon du cheval atteint d'ORVR, pourraient aussi être impliqués. En effet, les neutrophiles perdent la capacité de produire PTX3 *de novo* au cours de leur maturation mais ils stockent la protéine sous une forme "prête à l'emploi" dans leurs granules tertiaires (Jaillon *et al.*, 2002). Cependant, ces granules n'ont pu être mises en évidence. Soit les neutrophiles ont dégranulé avant ou au cours des manipulations, soit la technique immuno-histochimique utilisée n'était pas assez sensible pour permettre leur détection. Enfin, autre hypothèse, le niveau plus élevé de PTX3 dans le surnageant du LBA des chevaux atteints d'ORVR impliquerait les cellules épithéliales bronchiques. En effet, les travaux réalisés au cours de cette étude semblent montrer que PTX3 est surexprimée dans les cellules épithéliales bronchiques chez le cheval atteint d'ORVR. Considérant les cellules épithéliales comme un des types cellulaires majoritaires dans les voies respiratoires, PTX3 produite à ce niveau pourrait jouer un

rôle important dans le processus inflammatoire. Cette piste est intéressante sur le plan thérapeutique puisque l'activation de l'expression de PTX3 dans les cellules épithéliales bronchiques est sous le contrôle de JNK (Han *et al.*, 2005), un facteur différent de celui qui contrôle l'expression de PTX3 dans les leucocytes (NF- κ B).

Enfin, l'expression de PTX3 dans les cellules nucléées du LBA en réponse à différents stimuli (poussière de foin à différentes concentrations, LPS et *A. fumigatus*) a été investiguée *ex-vivo*. Après six heures et vingt-quatre heures, PTX3 était détectée dans toutes les conditions dans les cellules et dans les surnageants mais sans aucune différence significative d'une condition à l'autre. Ces résultats indiquent que la poussière et ses constituants ne seraient pas des inducteurs directs de PTX3. Les résultats de précédentes études (dos Santos *et al.*, 2004; Giguere *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2005; Herseth *et al.*, 2008; Okutani *et al.*, 2007) supportent l'hypothèse que PTX3 serait plutôt induite par des médiateurs de l'inflammation tels que notamment le TNF- α et l'IL-1 β .

5. Conclusions et perspectives

5.1. Conclusions

- 1) Le microdamier a permis d'identifier plusieurs gènes candidats pour une meilleure compréhension de la pathogénie de l'ORVR: *MARCKS*, *CYBB* et *PTX3*. Parmi ceux-ci, *PTX3* a été retenu pour faire l'objet de la seconde étude.
- 2) Les résultats de ce protocole ont également mis en avant les limites de l'utilisation du microdamier hétérologue humain dans l'espèce équine puisque certains gènes exprimés tels que l'*IL-1 β* et l'*IL-8* n'étaient pas détectés par le microdamier.
- 3) Une délétion de 120 paires de bases a été constatée dans la séquence génique du second exon de *PTX3*. Par ailleurs, un épissage alternatif du même exon a été mis en évidence.
- 4) Même s'ils ne montrent pas de signes cliniques, les chevaux sains développent eux aussi une réaction inflammatoire en réponse à un environnement poussiéreux.
- 5) *PTX3* est surexprimée dans les macrophages du LBA en réponse à une exposition à des poussières de foin et ce, chez les chevaux atteints d'ORVR mais aussi chez les chevaux sains.
- 6) Le niveau global de *PTX3* dans le surnageant du LBA est plus élevé chez les chevaux atteints d'ORVR que chez les chevaux sains.
- 7) Les résultats de l'immuno-histochimie indiquent une surexpression de *PTX3* dans les cellules épithéliales bronchiques chez les chevaux atteints d'ORVR en crise.

8) Les résultats de l'étude *ex-vivo* suggèrent que la poussière de foin et ses constituants sont des inducteurs indirects de PTX3.

5.2. Perspectives

5.2.1. Perspectives des moyens d'investigation

L'utilisation du microdamier humain pour mesurer l'expression des gènes chez le cheval atteint d'ORVR a permis de montrer le potentiel du microdamier en tant qu'outil prospectif mais il a également mis en avant les limites de l'utilisation d'un microdamier hétérologue. Depuis 2009, un microdamier spécifique au cheval est disponible sur le marché (*Equine Microarray*, Agilent®). Il s'agit à présent de tester l'efficacité de ce nouveau microdamier. Les résultats préliminaires d'une étude en cours montrent une bonne hybridation mais il reste un large travail d'annotation à accomplir, la plupart des sondes renvoyant à des gènes ou à des *expressed sequence tags* (ESTs) qui ne sont pas encore annotés dans l'espèce équine.

5.2.2. Perspectives fondamentales

Les fonctions de la partie amino-terminale codée par l'exon 2 de PTX3 sont encore mal connues. Il serait intéressant d'étudier les implications et répercussions liées à la délétion des 120 paires de base et à l'épissage alternatif de cet exon dans l'espèce équine. On peut par exemple se demander si la délétion reflète l'absence de fonction de cette séquence ou si, au contraire, elle pourrait expliquer la susceptibilité particulièrement élevée de l'espèce équine à certaines maladies telles que l'ORVR, le choc endotoxémique ou encore la fourbure. Il faudrait dans un premier temps déterminer si la forme épissée est active et si les deux formes de PTX3 cohabitent dans tous les types cellulaires ou si, d'un type cellulaire à l'autre, c'est la forme

épissée ou la forme complète de la protéine qui s'exprime. On sait que la partie amino-terminale de PTX3 intervient dans la liaison à FGF2, alors que c'est la partie carboxy-terminale qui intervient dans l'activation du complément. Mais pour la plupart des fonctions de PTX3, le domaine impliqué reste ignoré. L'épissage alternatif du second exon de PTX3 fournit ici une opportunité pour étudier les fonctions spécifiquement associées aux domaines N-terminal et C-terminal de la protéine *in-vivo*.

5.2.3. Perspectives thérapeutiques

Comme il a déjà été mentionné (Garlanda *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002), PTX3 peut avoir des effets bénéfiques ou délétères en fonction des circonstances. Il est difficile de déterminer si la surexpression de PTX3 dans le cas de l'ORVR reflète une tentative bénéfique mais insuffisante de l'organisme à résoudre la maladie ou si, au contraire, cette surexpression participe à la pathogénie de la maladie. En effet, l'efficacité de PTX3 a été démontrée dans les traitements de l'aspergillose (Gaziano *et al.*, 2004; D'Angelo *et al.*, 2009) mais PTX3 est aussi un amplificateur de l'inflammation, déjà exagérée lors d'ORVR. Bien que cela semble difficile à mettre en œuvre dans l'immédiat, notamment en raison des coûts associés élevés, les effets de l'administration de PTX3 recombinante équine sur une crise d'ORVR devraient être testés.

A l'heure actuelle, l'élément le plus important du traitement chez le cheval atteint d'ORVR est l'éviction de l'allergène. Cependant, lorsque l'éviction n'est pas possible, le traitement le plus efficace reste l'administration de glucocorticoïdes (GCs). Cependant, ce traitement s'accompagne d'effets secondaires non négligeables, notamment immunosuppression et fourbure chez le cheval. De manière intéressante, les GCs peuvent avoir des effets opposés sur la production de PTX3 en fonction des types cellulaires. Dans les CD4 et les macrophages, les

GCs inhibent l'expression de PTX3, probablement via NF- κ B. Au contraire, dans les cellules endothéliales et les fibroblastes, le promoteur de PTX3 est activé par les GCs (Doni et al, 2008). Cette disparité d'effets des GCs sur l'expression de PTX3 est vraisemblablement liée à un promoteur différent dans les cellules hématopoïétiques et dans les cellules non-hématopoïétiques. Dans les cellules épithéliales bronchiques, l'expression de PTX3 est gouvernée par JNK et non par NF- κ B. Il faudrait déterminer si JNK pourrait être le promoteur de PTX3 dans les cellules endothéliales et les fibroblastes. Par ailleurs, l'effet des GCs sur l'expression de PTX3 dans les cellules épithéliales bronchiques et les cellules alvéolaires devrait être testé. L'existence de deux promoteurs différents de PTX3 en fonction des types cellulaires offre l'opportunité d'agir de manière ciblée sur l'expression de PTX3. Les corticostéroïdes agissent soit en inhibant (trans-répression) soit en augmentant (trans-activation) la transcription de gènes cibles (McKay et Cidlowski, 1999). La trans-répression fait intervenir NF- κ B et résulte en l'inactivation du facteur de transcription (Adcock et Newton, 1998). Ainsi, d'une part, l'inhibition spécifique de NF- κ B devrait permettre de bénéficier de l'effet trans-répresseur mais pas trans-activateur des corticoïdes. D'autre part, en intervenant spécifiquement sur JNK, il devrait être possible de réguler la production de PTX3 dans les cellules non-hématopoïétiques. S'il s'avère que PTX3 participe à la pathogénie de l'ORVR, des inhibiteurs de JNK pourraient constituer une alternative dans le traitement des patients réfractaires ou peu sensibles aux corticoïdes.

5.2.4. Perspectives diagnostiques

Enfin, bien que de nombreuses études soient encore nécessaires avant que le dosage de PTX3 ne figure parmi les tests biochimiques de routine, PTX3 ouvre d'intéressantes perspectives sur le plan diagnostique. En effet, PTX3 augmente très rapidement, dans les six à huit heures qui

suivent l'initiation de l'inflammation, bien plus vite que la protéine réactive C (CRP). Des niveaux élevés de PTX3 ont été observés dans de multiples affections incluant les septicémies, les infections à *A. fumigatus*, la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) et la dengue (*flavivirus*). Pour certaines de ces maladies, le niveau de PTX3 est corrélé à l'activité et à la sévérité de la maladie et peut même s'avérer être le seul prédictateur indépendant de mortalité (Latini *et al.*, 2004). PTX3 pourrait ainsi représenter un marqueur rapide de l'activation primaire locale de l'immunité innée et de l'inflammation.

6. Bibliographie

ADCOCK I.M., NEWTON R. Transcription factors as activators and repressors of gene transcription: NF- κ B and glucocorticoid receptors. In: Holgate S.T., Busse W.W. (Eds), *Lung Biology in Health and Disease: Inflammatory Mechanisms in Asthma*, New York 1998, **117**, 907-924.

AINSWORTH D.M., GRUNIG G., MATYCHAK M.B., YOUNG J., WAGNER B., ERB H.N., ANTCZAK D.F. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2003, **96**, 83–91.

ANON. Chairperson's introduction: International Workshop on Equine Chronic Airway Disease, Michigan State University, 16-18 June 2000. *Equine Vet. J.*, 2001, **33**, 5-19.

ART T., KIRSCHVINK N., SMITH N., LEKEUX P. Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.*, 1999, **31**, 397-401.

BARNES P. J. Mechanisms in COPD: differences from asthma. *Chest*, 2000, **117**, 10–14.

BARNES P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology*, 2008, **8**, 183-192.

BARTNER LR, ROBINSON NE, KIUPEL M, TESFAIGZI Y. Persistent mucus accumulation: A consequence of delayed bronchial mucous cell apoptosis in RAO-affected horses ? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2006, **291**, 602-609.

BAYLY W. Lung function: limitations of current methods In: International workshop on equine chronic airway disease, Michigan State University, 16-17 June 2000. *Equine Vet. J.*, 2001, **33**, 5-19.

BEADLE R.E., HOROHOV D.W., GAUNT S.D. Interleukin-4 and interferon-gamma gene expression in summer pasture-associated obstructive pulmonary disease affected horses, *Equine Vet. J.*, 2002, **34**, 389–394.

BILYK N, HOLT PG. Inhibition of the immunosuppressive activity of resident pulmonary alveolar macrophages by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 1993, **177**, 1773-1777.

BILYK N, HOLT PG. Cytokine modulation of the immunosuppressive phenotype of pulmonary alveolar macrophage populations. *Immunology*, 1995, **86**, 231-237.

BOTTAZZI B., GARLANDA C., SALVATORI G., JEANNIN P., MANFREDI A., MANTOVANI A. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2006, **18**, 10–15.

BOTTAZZI B., VOURET-CRAVIARI V., BASTONE A., DE GIOIA L., MATTEUCCI C., PERI G., SPREAFICO F., PAUSA M., D'ETTORRE C., GIANAZZA E., TAGLIABUE A., SALMONA M., TEDESCO F., INTRONA M., MANTOVANI A. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 32817-32823.

BOWLES K.S., BEADLE R.E., MOUCH S., POURCIAU S.S., LITTLEFIELD-CHABAUD M.A., LE BLANC C., MISTRIC L., FERMAGLICH D., HOROHOV D.W. A novel model for equine recurrent airway obstruction, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002, **87**, 385-389.

BOZZA S., BISTONI F., GAZIANO R., PITZURRA L., ZELANTE T., BONIFAZI P., PERRUCCIO K., BELLOCCHIO S., NERI M., IORIO A.M., SALVATORI G., DE SANTIS R., CALVITTI M., DONI A., GARLANDA C., MANTOVANI A., ROMANI L. Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. *Blood*, 2006, **108**, 3387–3396.

BREEZE RG. The problem of disease definition. *Vet. Clin. N. Am. Large An. Pract.*, 1979, **1**, 219-230.

BREVIARIO F., D'ANIELLO E.M., GOLAY J., PERI G., BOTTAZZI B., BAIROCH A., SACCONI S., MARZELLA R., PREDAZZI V., ROCCHI M., DELLA VALLE G., DEJANA E., MANTOVANI A., INTRONA M. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells cloning of a new gene related to c-reactive protein and serum amyloid p component. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 22190–22197.

BRINKMANN V., REICHARD U., GOOSMANN C., FAULER B., UHLEMANN Y., WEISS D.S., WEINRAUCH Y., ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, **303**, 1532–1535.

BRYANT P.A., VENTER D., ROBINS-BROWNE R., CURTIS N. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect. Dis.*, 2004, **4**, 100-111.

BUREAU F., BONIZZI G., KIRSCHVINK N., DELHALLE S., DESMECHT D., MERVILLE M.P., BOURS V., LEKEUX P. Correlation between nuclear factor- κ B activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000a, **161**, 1314-1321.

BUREAU F., DELHALLE S., BONIZZI G., FIÉVEZ L., DOGNÉ S., KIRSCHVINK N., DESMECHT D., MERVILLE M.P., BOURS V., LEKEUX P. An autocrine mechanism maintains persistent NF- κ B activation in the bronchi of an animal model of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000b, **160**, 1035-1042.

CARAMORI G., ROMAGNOLI M., CASOLARI P., BELLETTATO C., CASONI G., BOSCHETTO P., CHUNG K.F., BARNES P.J., ADCOCK I.M., CIACCIA A., FABBRI L.M., PAPI A. Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax*, 2003, **58**, 348–351.

CHUAQUI R.F., GILLESPIE J.W. FLAIG M.J., HEWITT S.M., PHILLIPS J.L., KRIZMAN D.B., TANGREA M.A., AHRAM M., LINEHAN W.M., KNEZEVIC V., EMMERT-BUCK M.R. Post analysis follow up and validation of microarray experiments. *Nat. Genet.*, 2002, **32**, 509-514.

CORDEAU M.E., JOUBERT P., DEWACHI O., HAMID Q., LAVOIE J.P. IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2003, **97**, 87–96.

COTENA A., MAINA V., SIRONI M., BOTTAZZI B., JEANNIN P., VECCHI A., CORVAIA N., DAHA M.R., MANTOVANI A., GARLANDA C. Complement dependent amplification of the innate response to a cognate microbial ligand by the long pentraxin PTX3. *J. Immunol.*, 2007, **179**, 6311–6317.

COUËTIL L.L., DENICOLA D.B., CHILCOAT C.D. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 538-545.

D'ANGELO C., DE LUCA A., ZELANTE T., BONIFAZI P., MORETTI S., GIOVANNINI G., IANNITTI R.G., ZAGARELLA S., BOZZA S., CAMPO S., SALVATORI G., ROMANI L. Exogenous pentraxin 3 restores antifungal resistance and restrains inflammation in murine chronic granulomatous disease. *J. Immunol.*, 2009, **183**, 4609-4618.

DAWSON K.A. Nutrigenomics: feeding the genes for improved fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, 2006, **96**, 312-322.

DEBAN L., JARVA H., LEHTINEN M.J., BOTTAZZI B., BASTONE A., DONI A., JOKIRANTA T.S., MANTOVANI A., MERI S. Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. *J. Immunol.*, 2008, **181**, 8433-8440.

DEBRUE M., HAMILTON E., JOUBERT P., LAJOIE-KADOCH S., LAVOIE J.P. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005, **105**, 25-31.

DINIZ S.N., NOMIZO R., CISALPINO P.S., TEIXEIRA M.M., BROWN G.D., MANTOVANI A., GORDON S., REIS L.F., Dias A.A. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, **75**, 649–656.

DIXON P.M., RAILTON D.I., MCGORUM B.C. Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 3: Ancillary diagnostic findings. *Equine Vet. J.*, 1995, **27**, 428-435.

DONI A., MANTOVANI G., PORTA C., TUCKERMANN J., REICHARDT H.M., KLEIMAN A., SIRONI M., RUBINO L., PASQUALINI F., NEBULONI M., SIGNORINI S., PERI G., SICA A., BECK-PECCOZ P., BOTTAZZI B., MANTOVANI A. Cell-specific regulation of PTX3 by glucocorticoid hormones in hematopoietic and nonhematopoietic cells. *J. Biol. Chem.*, 2008, 31, **283**, 29983-29992.

DONI A., MICHELA M., BOTTAZZI B., PERI G., VALENTINO S., POLENTARUTTI N., GARLANDA C., MANTOVANI A. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, **79**, 797–802.

DONI A., PERI G., CHIEPPA M., ALLAVENA P., PASQUALINI F., VAGO L., ROMANI L., GARLANDA C., MANTOVANI A. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 2003, **33**, 2886-2893.

DOS SANTOS C.C., HAN B., ANDRADE C.F., BAI X., UHLIG S., HUBMAYR R., TSANG M., LODYGA M., KESHAVJEE S., SLUTSKY A.S., LIU M. DNA microarray analysis of gene expression in alveolar epithelial cells in response to TNF- α , LPS, and cyclic stretch. *Physiol. Genomics*, 2004, **19**, 331–342.

FRANCHINI M., GILLI U., AKENS M.K., FELLEBERG R.V., BRACHER V. The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998, **66**, 53-65.

FUCHS T.A., ABED U., GOOSMANN C., HURWITZ R., SCHULZE I., WAHN V., WEINRAUCH Y., BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell. Biol.*, 2007, **176**, 231–241.

GANTNER B.N., SIMMONS R.M., CANAVERA S.J., AKIRA S., UNDERHILL D.M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.*, 2003, **197**, 1107–1117.

GARLANDA C., BOTTAZZI B., BASTONE A., MANTOVANI A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005, **23**, 337-366.

GARLANDA C., HIRSCH E., BOZZA S., SALUSTRI A., DE ACETIS M., NOTA R., MACCAGNO A., RIVA F., BOTTAZZI B., PERI G., DONI A., VAGO L., BOTTO M., DE SANTIS R., CARMINATI P., SIRACUSA G., ALTRUDA F., VECCHI A., ROMANI L., MANTOVANI A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*, 2002, **420**, 182-186.

GAZIANO R., BOZZA S., BELLOCCHIO S., PERRUCCIO K., MONTAGNOLI C., PITZURRA L., SALVATORI G., DE SANTIS R., CARMINATI P., MANTOVANI A., ROMANI L. Anti-*Aspergillus fumigatus* efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 4414-4421.

GERBER H. Sir Frederick Hobday memorial lecture. The genetic basis of some equine diseases. *Equine Vet. J.*, 1989, **21**, 244-248.

GERBER V., BALERI D., KLUKOWSKA-RÖTZLER J., SWINBURNE J.E., DOLF G. Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction. *J. Vet. Intern. Med.*, 2009, **23**, 626-630.

GIGUERE S., VIEL L., LEE E., MACKAY R.J., HERNANDEZ J., FRANCHINI M. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002, **85**, 147–158.

HALLIWELL R.E., MCGORUM B.C., IRVING P, DIXON P.M. Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1993, **38**, 201-215.

HAN B., MURA M., ANDRADE C.F., OKUTANI D., LODYGA M., DOS SANTOS C.C., KESHAVJEE S., MATTHAY M., LIU M. TNF-alpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. *J. Immunol.*, 2005, **175**, 8303–8311.

HANSEL N.N., HILMER S.C., GEORAS S.N., COPE L.M., GUO J., IRIZARRY R.A., DIETTE G.B. Oligonucleotide-microarray analysis of peripheral-blood lymphocytes in severe asthma. *J. Lab. Clin. Med.*, 2005, **145**, 263-274.

HART L.A., KRISHNAN V.L., ADCOCK I.M., BARNES P.J., CHUNG K.F. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor- κ B, in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998, **158**, 1585–1592.

HERSETH J.I., VOLDEN V., SCHWARZE P.E., LÅG M., REFSNES M. IL-1beta differently involved in IL-8 and FGF-2 release in crystalline silica-treated lung cell co-cultures. *Part. Fibre. Toxicol.*, 2008, **13**, 5-16.

HOLT P.G., STRICKLAND D.H., WIKSTRÖM M.E., JAHNSEN F.L. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, **8**, 142-152.

HOROHOV D.W., BEADLE R.E., MOUCH S., POURCIAU S.S. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005, **108**, 237-245.

INFORZATO A., PERI G., DONI A., GARLANDA C., MANTOVANI A., BASTONE A., CARPENTIERI A., AMORESANO A., PUCCI P., ROOS A., DAHA M.R., VINCENTI S., GALLO G., CARMINATI P., DE SANTIS R., SALVATORI G. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. *Biochemistry*, 2006, **45**, 11540-11551.

IZUHARA K., SAITO H. Microarray-based identification of novel biomarkers in asthma. *Allergol. Int.*, 2006, **55**, 361-367.

JEFFERY P.K. Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma. *Chest*, 2000, **117**, 251–260.

JAILLON S., PERI G., DELNESTE Y., FREMAUX I., DONI A., MOALLI F., GARLANDA C., ROMANI L., GASCAN H., BELLOCCHIO S., BOZZA S., CASSATELLA M.A., JEANNIN P., MANTOVANI A. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J. Exp. Med.*, 2007, **204**, 793-804.

JEANNIN P., BOTTAZZI B., SIRONI M., DONI A., RUSNATI M., PRESTA M., MAINA V., MAGISTRELLI G., HAEUW J.F., HOEFFEL G., THIEBLEMONT N., CORVAIA N., GARLANDA C., DELNESTE Y., MANTOVANI A. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity*, 2005, **22**, 551–560.

JOST U., KLUKOWSKA-ROTZLER J., DOLF G., SWINBURNE J.E., RAMSEYER A., BUGNO M., BURGER D., BLOTT S., GERBER V. A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses. *Equine Vet. J.*, 2007, **39**, 236-241.

KATO S., OCHIAI M., SAKURADA T., OHNO S., MIYAMOTO K., SAGARA M., ITO M., TAKEUCHI K., IMAKI J., ITOH K., YAKABI K. Increased expression of long pentraxin PTX3 in inflammatory bowel diseases. *Dig. Dis. Sci.*, 2008, **53**, 1910-1916.

KLEIBER C., MCGORUM B.C., HOROHOV D.W., PIRIE R.S., ZURBRIGGEN A., STRAUB R. Cytokine profiles of peripheral blood and airway CD4 and CD8 T lymphocytes in horses with recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005, **104**, 91-97.

KRAFT M. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease exhibit common origins in any country. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006, **174**, 238–240.

LAAN T.T.J.M., BULL S., PIRIE R.S., FINK-GREMMELS J. Evaluation of cytokine production by equine alveolar macrophages exposed to lipopolysaccharide, *Aspergillus fumigatus*, and a suspension of hay dust. *Am. J. Vet. Res.*, 2005, **66**, 1584-1589.

LAAN T.T.J.M., BULL S., PIRIE R., FINK-GREMMELS J. The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *J. Vet. Intern. Med.*, 2006, **20**, 167-174.

LAPRISE C., SLADEK R., PONTON A., BERNIER M.C., HUDSON T.J., LAVIOLETTE M. Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics*, 2004, **23**, 21.

LATINI R., MAGGIONI A.P., PERI G., GONZINI L., LUCCI D., MOCARELLI P., VAGO L., PASQUALINI F., SIGNORINI S., SOLDATESCHI D., TARLI L., SCHWEIGER C., FRESCO C., CECERE R., TOGNONI G., MANTOVANI A. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation*, 2004, **110**, 2349-2354.

LAVOIE J., MAGHNI K., DESNOYERS M., TAHA R.A., MARTIN J. AND HAMID Q. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, **164**, 1410–1413.

LEE G.W., LEE T.H., VILCEK J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and il-1-inducible protein, is a novel member of the pentraxin family of acute phase proteins. *J. Immunol.*, 1993, **150**, 1804–1812.

LEGUILLETTE R. Recurrent airway obstruction-heaves. *Vet. Clin. Equine Pract.*, 2003, **19**, 63-86.

LUGO J., HARKEMA J.R., DEFEIJTER-RUPP H., BARTNER L., BORUTA D., ROBINSON N.E. Airway inflammation is associated with mucous cell metaplasia and increased intraepithelial stored mucosubstances in horses. *Vet. J.*, 2006, **172**, 293-301.

MACLEAN J.A., XIA W., PINTO C.E., ZHAO L., LIU H.W., KRADIN R.L. Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity. *Am. J. Pathol.*, 1996, **148**, 657-666.

MALAPONTE G., LIBRA M., BEVELACQUA Y., MERITO P., FATUZZO P., RAPISARDA F., CRISTINA M., NASELLI G., STIVALA F., MAZZARINO M.C., CASTELLINO P. Inflammatory status in patients with chronic renal failure: the role of PTX3 and pro-inflammatory cytokines. *Int. J. Mol. Med.*, 2007, **20**, 471-481.

MARTI E, GERBER H, ESSICH G, OULEHLA J, LAZARY S. The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet. J.*, 1991, **23**, 457-460.

MARTI E., GERBER V., WILSON A.D., LAVOIE J.P., HOROHOV D., CRAMERI R., LUNN D.P., ANTCZAK D., BJÖRNSDÓTTIR S., BJÖRNSDÓTTIR T.S., CUNNINGHAM F., DÉRER M., FREY R., HAMZA E., HORIN P., HEIMANN M., KOLM-STARK G., OLAFSDÓTTIR G., RAMERY E., RUSSELL C., SCHAFFARTZIK A., SVANSSON V., TORSTEINSDÓTTIR S., WAGNER B. Report of the 3rd Havemeyer workshop on allergic diseases of the Horse, Hólar, Iceland, June 2007. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2008, **126**, 351-361.

MATSUKURA S., STELLATO C., PLITT J.R., BICKEL C., MIURA K., GEORAS S.N., CASOLARO V., SCHLEIMER R.P. Activation of eotaxin gene transcription by NF-kappa B and STAT6 in human airway epithelial cells. *J. Immunol.*, 1999, **163**, 6876-6883.

MCKAY L.I., CIDLOWSKI J.A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signalling pathways. *Endocr. Rev.*, 1999, **20**, 435-459.

MUNGER J.S., HUANG X., KAWAKATSU H., GRIFFITHS M.J., DALTON S.L., WU J., PITTET J.F., KAMINSKI N., GARAT C., MATTHAY M.A., RIFKIN D.B., SHEPPARD D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.*, 1999, **96**, 319-328.

MOODY D.E. Genomic techniques: an overview of methods for the study of gene expression. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 128–135.

MOORE B.R., KRAKOWKA S., ROBERTSON J.T., CUMMINS J.M. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid obtained from standardbred racehorses with inflammatory airway disease. *Am. J. Vet. Res.*, 1995, **56**, 562-566.

MOORE K.W., DE WAAL MALEFYT R., COFFMAN R.L., O'GARRA A. Interleukin-10 and the interleukin- 10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, **19**, 683–765.

MULLER B., PERI G., DONI A., TORRI V., LANDMANN R., BOTTAZZI B., MANTOVANI A. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit. Care Med.*, 2001, **29**, 1404-1407.

MÜLLER, M., KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat. Rev. Genet.*, 2003, **4**, 315-322.

MUNGER J.S., HUANG X., KAWAKATSU H., GRIFFITHS M.J., DALTON S.L., WU J., PITTET J.F., KAMINSKI N., GARAT C., MATTHAY M.A., RIFKIN D.B., SHEPPARD D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.*, 1999, **96**, 319-328.

NADON R., SHOEMAKER J. Statistical issues with microarrays: processing and analysis, *Trends Genet.*, 2002, **18**, 265-271.

NAPOLEONE E., DI SANTO A., BASTONE A., PERI G., MANTOVANI A., DE GAETANO G., DONATI M.B., LORENZET R. Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 2002, **22**, 782–787.

NAPOLEONE E., DI SANTO A., PERI G., MANTOVANI A., DE GAETANO G., DONATI M.B., LORENZET R. The long pentraxin PTX3 up-regulates tissue factor in activated monocytes: another link between inflammation and clotting activation. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, **76**, 203–209.

NAUTA A.J., BOTTAZZI B., MANTOVANI A., SALVATORI G., KISHORE U., SCHWAEBLE W.J., GINGRAS A.R., TZIMA S., VIVANCO F., EGIDO J., TIJMSMA O., HACK E.C., DAHA M.R., ROOS A. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur. J. Immunol.*, 2003, **33**, 465-473.

OKUTANI D., HAN B., MURA M., WADDELL T.K., KESHAVJEE S., LIU M. High-volume ventilation induces pentraxin 3 expression in multiple acute lung injury models in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2007, **292**, 144-153.

PEPYS M.B., Hirschfield G.M. C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.*, 2003, **111**, 1805–1812.

PIRIE R.S. Allergic Respiratory Disease: Where are we now *Proceeding of the European Veterinary Conference Voorjaarsdagen*, Amsterdam, Netherlands, 24-26 April, 2008.

PIRIE R.S., DIXON P.M., MCGORUM B.C. Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to *Aspergillus fumigatus* extract inhalation in heaves horses. *Clin. Exp. Allergy*, 2003, **33**, 1289-1296.

POLENTARUTTI N., BOTTAZZI B., DI SANTO E., BLASI E., AGNELLO D., GHEZZI P., INTRONA M., BARTFAI T., RICHARDS G., MANTOVANI A. Inducible expression of the long pentraxin PTX3 in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.*, 2000, **106**, 87-94.

RAMERY E., CLOSSET R., BUREAU F., ART T., LEKEUX P. Relevance of using a human microarray to study gene expression in heaves-affected horses. *Vet. J.*, 2008, **177**, 216-221.

RAMERY E., CLOSSET R., ART T., BUREAU F., LEKEUX P. Expression microarrays in equine sciences. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2009, **127**, 197-202.

RAMERY E, FIEVEZ L, FRAIPONT A, BUREAU F, LEKEUX P. Characterization of pentraxin 3 in the horse and its expression in airways. *Vet. Res.*, 2010, **41**,18.

RAMSEYER A., GAILLARD C., BURGER D., STRAUB R., JOST U., BOOG C., MARTI E., GERBER V. Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses. *J. Vet. Intern. Med.*, 2007, **21**, 149-156.

READING P.C. BOZZA S., GILBERTSON B., TATE M., MORETTI S., JOB E.R., CROUCH E.C., BROOKS A.G., BROWN L.E., BOTTAZZI B., ROMANI L., MANTOVANI A. Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. *J. Immunol.*, 2008, **180**, 3391–3398.

REN J., PRESCOTT J.F. The effect of mutation on *Rhodococcus equi* virulence plasmid gene expression and mouse virulence. *Vet. Microbiol.*, 2004, **103**, 219-230.

ROBINSON N.E. COPD, RAO, Heaves, IAD: Sorting out the Phenotypes of Chronic Airway Disease in the Horse. *Proceedings of the Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology* - Tucson, Arizona, 2006.

ROBINSON N.E. Recurrent airway obstruction (Heaves). In: Lekeux P. (Ed.), Equine Respiratory Diseases. *International Veterinary Information Service*, (www.ivis.org), Ithaca NY 2001.

ROBINSON N.E., DERKSEN F.J., OLSZEWSKI M., BUECHNER-MAXWELL V.A. The pathogenesis of obstructive pulmonary disease of horses. *Br. Vet. J.*, 1996, **152**, 283-306.

ROTTMAN J.B., TOMPKINS W.A., TOMPKINS M.B. A reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) technique to measure cytokine gene expression in domestic mammals. *Vet. Pathol.*, 1996, **33**, 242-248.

ROVERE P., PERI G., FAZZINI F., BOTTAZZI B., DONI A., BONDANZA A., ZIMMERMANN V.S., GARLANDA C., FASCIO U., SABBADINI M.G., RUGARLI C., MANTOVANI A., MANFREDI A.A. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood*, 2000, **96**, 4300-4306.

RUSH B.R., RAUB E.S., RHODES W.S., FLAMINIO M.J., HAKALA J.E., GILLESPIE J.R. Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone. *Am. J. Vet. Res.*, 1998, **59**, 1039-1043.

RUSNATI M., CAMOZZI M., MORONI E., BOTTAZZI B., PERI G., INDRACCOLO S., AMADORI A., MANTOVANI A., PRESTA M. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood*, 2004, **104**, 92-99.

RYLANDER R. Diseases associated with exposure to plant dusts: focus on cotton dust. *Tuber Lung Dis.*, 1992, **73**, 21-26.

SALUSTRI A., GARLANDA C., HIRSCH E, DE ACETIS M., MACCAGNO A., BOTTAZZI B., DONI A., BASTONE A., MANTOVANI G., BECK PECCOZ P., SALVATORI G., MAHONEY D.J., DAY A.J., SIRACUSA G., ROMANI L., MANTOVANI A. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development*, 2004, **131**, 1577-1586.

SAVCHENKO A., IMAMURA M., OHASHI R., JIANG S., KAWASAKI T., HASEGAWA G., EMURA I., IWANARI H., SAGARA M., TANAKA T., HAMAKUBO T., KODAMA T., NAITO M. Expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerotic lesions. *J. Pathol.*, 2008, **215**, 48-55.

SCHAEFER W. Untersuchungen ueber die Erbllichkeit und das Wesen des Lungendampfes beim Pferd. *Tieraerztliche Rundschau*, 1939, **31**, 595-599.

SOARES A.C., SOUZA D.G., PINHO V., VIEIRA A.T., NICOLI J.R., CUNHA F.Q., MANTOVANI A., REIS L.F.L., DIAS A.A.M., Teixeira M.M. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. *Microbes and Infect.*, 2006, **8**, 1321-1329.

SOUZA D.G., SOARES A.C., PINHO V., TORLONI H., REIS L.F., TEIXEIRA M.M., DIAS A.A. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am. J. Pathol.*, 2002, **160**, 1755–1765.

SWINBURNE J.E., BOGLE H., KLUKOWSKA-RÖTZLER J., DRÖGEMÜLLER M., LEEB T., TEMPERTON E., DOLF G., GERBER V. A whole-genome scan for recurrent airway obstruction in Warmblood sport horses indicates two positional candidate regions. *Mamm. Genome.*, 2009, **20**, 504-515.

THOMAS A., CLOSSET R., BUREAU F., LEKEUX P. Principes des microdamiers à ADN et applications potentielles en sciences vétérinaires. *Ann. Med. Vet.*, 2005, **149**, 93-116.

THURLBECK W.M., LOWELL F.C. Heaves in horses. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1964, **89**, 82-88.

TREMBLAY G.M., FERLAND C., LAPOINTE J.M., VRINS A., LAVOIE J.P., CORMIER Y. Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet. J.*, 1993, **25**, 194-197.

VAN ERCK E., VOTION D., LEKEUX P. Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Vet. J.*, 2004, **1**, 21-28.

VAN ROSSUM A.P., PAS H.H., FAZZINI F., HUITEMA M.G., LIMBURG P.C., JONKMAN M.F., KALLENBERG C.G. Abundance of the long pentraxin PTX3 at sites of leukocytoclastic lesions in patients with small-vessel vasculitis. *Arthritis Rheum.*, 2006, **54**, 986-991.

VARANI S., ELVIN J.A., YAN C., DEMAYO J., DEMAYO F.J., HORTON H.F., BYRNE M.C., MATZUK M.M. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol. Endocrinol.*, 2002, **16**, 1154-1167.

VIDAL ALLES V., BOTTAZZI B., PERI G., GOLAY J., INTRONA M., MANTOVANI A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood*, 1994, **84**, 3483–3493.

WARREN C.P. Lung disease in farmers. *Can. Med. Assoc. J.*, 1977, 19, **116**, 391–394.

WILLMENT J.A., BROWN G.D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol.*, 2008, **16**, 27–32.

WINTER H., VAN DEN ENGEL N.K., RÜTTINGER D., SCHMIDT J., SCHILLER M., POEHLEIN C.H., LÖHE F., FOX B.A., JAUCH K.W., HATZ R.A., HU H.M. Therapeutic T cells induce tumor-directed chemotaxis of innate immune cells through tumor-specific secretion of chemokines and stimulation of B16BL6 melanoma to secrete chemokines. *J. Transl. Med.*, 2007, **14**, 5:56.

ZIMMERMANN N., KING N.E., LAPORTE J., YANG M., MISHRA A., POPE S.M., MUNTEL E.E., WITTE D.P., PEGG A.A., FOSTER P.S., HAMID Q., ROTHENBERG M. E. Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J. Clin. Invest.*, 2003, **111**, 1863-1874.

ZIPFEL P.F., HALLSTRÖM T., HAMMERSCHMIDT S., SKERKA C. The complement fitness factor H: role in human diseases and for immune escape of pathogens, like pneumococci. *Vaccine*, 2008, **26**, 67-74.